Aus der
I. Medizinischen Universitätsklinik München (Prof. Dr. Stepp)

Über biologisch wichtige Polysaccharide
und eine neue Methode zu ihrer Charakterisierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Maximilians-Universität München
vorgelegt von

Gerhard Wilke

Dem Andenken meiner Mutter

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548311_0044

Aus der
I. Medizinischen Universitätsklinik München (Prof. Dr. Stepp)

Über biologisch wichtige Polysaccharide
und eine neue Methode zu ihrer Charakterisierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Maximilians-Universität München
vorgelegt von

Gerhard Wilke

Referent: Prof. Dr. Stepp
Tag der mündlichen Prüfung: 20. 12. 38

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 7

A. Theoretischer Teil 9

I. Die einfachen pflanzlichen Polysaccharide . . . 9

1. Cellulose 9
2. Cellulosane 9
3. Stärke 10
4. Inuline 10
5. Mannan 11
6. Fukoidin und Agar-Agar 11

II. Die komplexen pflanzlichen Polysaccharide . . . 12

1. Die Hemicellulosen 12
2. Pektin 12
3. Die Pflanzengummen 14
   a) Gummi arabicum 14
   b) Mesquite-Gummi 15
   c) Gummi Tragacanth 15
   d) Cholla-Gummi 15
   e) Kirschgummi 16
4. Die Pflanzenschleime 16

III. Die einfachen tierischen Polysaccharide . . . 16

1. Glykogen 16
2. Fruktogen 17
3. Galaktogen 18

IV. Die komplexen tierischen Polysaccharide . . . 18

1. Mukoide 18
   a) Mukoitinschwefelsäure 18
   b) Chondroitinschwefelsäure 19
   c) Mukoid des Magensaftes 19
   d) Heparin 19

2. Blutgruppen-Polysaccharide 20
a) Vorkommen der Gruppenstoffe 20
b) Chemie „ „ „ 21
3. Der „Eiweißzucker" des Blutes 21
a) Geschichte 21
b) Vorkommen des Eiweißzuckers 22
c) Bestimmung „ „ 23
d) Pathologie „ „ 24
e) Bedeutung „ „ 25
4. Die Antigen-Polysaccharide der Bakterien 26
a) Pneumokokken-Antigene 26
b) Tuberkel-Antigene 29
c) Streptokokken-Antigene 30
d) Choleravibrionen-Antigene 30
e) Antigene schmarotzender Würmer 30

B. Praktischer Teil 32

I. Die fraktionierte Hydrolyse mit verdünnter Säure als Methode zur Charakterisierung von Polysacchariden

1. Bisherige Möglichkeiten der Charakterisierung von Polysacchariden 32
2. Fraktionierte Hydrolyse als Mittel zur Konstitutionsaufklärung 33
3. Prinzip der Methode der Vorversuche 34
4. Ergebnisse der Vorversuche 36
a) Glykogen- und Stärkekurven 36
b) Apfelpektin-Kurven 37
c) Citropektin- und Arabankurven . . . 39
d) Mischkurven 40
5. Kritik der Vorversuche 41

II. Die kontinuierliche Beobachtung der Hydrolyse von Polysacchariden mittels einer elektropotentiometrischen Methode 41

1. Prinzip der elektropotentiometrischen Titration . . 42
2. Notwendige Voraussetzungen einer potentiometrischen Methode für die kontinuierliche Verfolgung der Hydrolyse 42
3. Das Bichromat im elektropotentiometrischen System . . 43
4. Prinzip und Ausführung der elektropotentiometrischen Methode zur kontinuierlichen Beobachtung der Hydrolyse von Polysacchariden 43
5. Versuchsergebnisse 45
6. Kritik der Ergebnisse 48

Zusammenfassung 49

Einleitung

Die letzten Jahre der Forschung haben erwiesen, eine wie große Bedeutung die Polysaccharide in der Tierwelt besitzen. Vor einigen Jahrzehnten wußte man etwas Genaueres nur über die Glukose und das aus Glukose zusammengesetzte Glykogen. Andere Zucker und vor allem Polysaccharide waren im Tierkörper so gut wie nicht bekannt. Im Pflanzenreich beobachtete man dagegen zahlreiche verschiedene Monosaccharide und isolierte ebenso viele verschiedenartige Polysaccharide.

Es war eigentlich merkwürdig, daß im Tierkörper nur ein Zucker und nur ein Polysaccharid eine überragende Rolle spielen und andere Zuckerarten und Polysaccharide nicht anwesend sein sollten. Bei allen anderen biologischen Verbindungen bestehen große verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Pflanzen- und Tierwelt. Das Hämoglobin ist mit dem Blattfarbstoff Chlorophyll verwandt, pflanzliche und tierische Eiweißkörper ähneln sich, wenn auch diese und jene Aminosäure fehlt.

Es war also mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu vermuten, daß die so zahlreichen pflanzlichen Polysaccharide in der Tierwelt Verwandte haben. In der Tat hat sich nun gezeigt, daß in den tierischen Säften und Zellen ebenfalls eine Reihe von Polysacchariden vorkommen, die sicherlich auch bedeutende Funktionen besitzen. Die tierischen sind im Gegensatz zu den allermeisten pflanzlichen Sacchariden an Eiweiß gekoppelt.

Als erstes Polysaccharid fand man im Blut einen Stoff, der aus Glukosamin, Galaktose und Mannose zusammengesetzt ist und hauptsächlich an die Globuline des Blutes gekoppelt ist. Während man über die Bedeutung dieses Stoffes noch nichts Näheres weiß, erscheint uns ein anderes Polysaccharid schon ganz bedeutend interessanter. Dieser komplexe Zucker stellt nämlich den Blutgruppenstoff dar. Er ist u. a. aus den Bausteinen Galaktose, Acetylglukosamin und Uronsäuren zusammengesetzt, wobei die verschiedenen Gruppenstoffe A, B, AB, O höchstwahrscheinlich nur durch ganz feine Konstitutionsunterschiede voneinander abweichen.

Vielleicht noch interessanter ist die Erkenntnis, daß die Bakterienantigene zu einem großen Teile Polysaccharide sind. Auch hier sind wieder als Baustein Galaktose, Glukosamin, Glukose und verschiedene Uronsäuren, vor allem Aldobionsäure gefunden worden.

Mit den bisherigen chemischen Kenntnissen über diese Stoffe ist uns natürlich noch nicht viel gedient. Wir wollen wissen, warum diese Stoffe so große und besondere Wirkungen entfalten. Die Einzelbausteine, aus denen sie zusammengesetzt sind, zeigen diese Wirkungen nie. Die besonderen Eigenschaften der Polysaccharide können deshalb nur im strukturellen Feinbau begründet liegen. Das Ziel heißt also völlige Strukturaufklärung der tierischen Polysaccharide.

Die Strukturaufklärung hochmolekularer Stoffe gehört aber mit zu den schwierigsten Kapiteln der Chemie und ist deshalb auch erst bei einigen wenigen Polysacchariden gelungen. Bei den tierischen komplexen Zuckern sind die Schwierigkeiten besonders groß. Allein die Isolation der Stoffe stellt bedeutende Anforderungen. Überall im Tierkörper sind Fermente des Stoffwechsels vorhanden, die auch noch nach dem Tode weiterwirken. Überall sind große Mengen Eiweiß anwesend, die bei der Darstellung störend wirken. Man weiß deshalb oft nicht, ob man einen Stoff nach der Isolation verändert vorliegen hat, ob Beimengungen vorhanden sind.

Es ist nun die Grundvoraussetzung zur Konstitutionsaufklärung von komplexen Stoffen, daß man sie zuvor genau charakterisieren kann. Während bei niedermolekularen Stoffen diese Charakterisierung verhältnismäßig leicht ist, gibt es nur wenige Reaktionen, die für die Polysaccharide geeignet sind. So feine und geringfügige Unterschiede im Aufbau, wie wir sie hier zu erwarten haben, lassen sich mit den meisten bisherigen Methoden nicht erkennen.

Wir haben deshalb versucht, eine Methode zu finden, die uns gestattet, auch sehr nahe verwandte Polysaccharide noch scharf zu charakterisieren. Wir verfolgen dabei kontinuierlich die Hydrolyse von Polysacchariden mittels einer elektropotentiometrischen Methode.

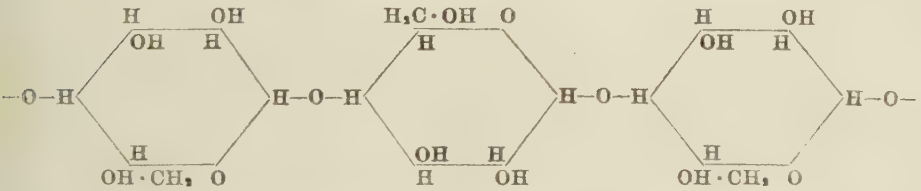
Bevor wir diese Methode und die damit bis jetzt gefundenen Werte schildern werden, soll ein kurzer Überblick den jetzigen Stand der Kenntnisse in der Polysaccharid-Chemie aufzeigen. Da die pflanzlichen Polysaccharide viel besser untersucht sind als die tierischen und Stoffe, wie die Pflanzengummen eine große Ähnlichkeit mit den Bakterienantigenen besitzen, sollen auch die für die biologischen Verhältnisse wichtigen pflanzlichen Polysaccharide erwähnt werden.

A. Theoretischer Teil

I. Die einfachen pflanzlichen Polysaccharide

1. Cellulose.

An der Spitze dieser Zusammenstellung stehe die Cellulose. Sie ist das einzige Polysaccharid, über dessen Aufbau die größte Einigkeit herrscht. Auf Grund der verschiedensten chemischen und physikalischen Untersuchungsmethoden ist man zu einer Kette mit der unten stehenden Formel gekommen.



Die Cellulose setzt sich also aus einer Kette von Cellobiosemolekülen zusammen. Ob am Ende der Kette eine freie Carboxylgruppe steht, weiß man noch nicht mit völliger Sicherheit. Über die Länge der Kette und über die Bindung einzelner Ketten untereinander durch Nebenvalenzen, zu sogenannten Mizellen, besteht noch keine Einigkeit.

Die Bestimmungen mittels Roentgenographie, der Ultrazentrifuge und der Osmose von Nitro- und Acetylcellulosen kommen auf eine Kette von 200 Gliedern, während mit der Viskositätsmethode Kettenlängen von 750 gefunden werden (1).

2. Cellulosane.

Zusammen mit der nativen Pflanzencellulose kommen noch sogen. Cellulosane vor. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Xylan.

Xylan kann durch heiße Alkalien nur unter Druck von der Cellulose entfernt werden, oder aber durch Hydrolyse mit verdünnten Säuren, wobei es aber selbst schon einer Aufspaltung unterliegt.

Xylan setzt sich aus etwa 20 Xylosemolekülen zusammen. Einzelne Forscher glauben, daß im Molekül auch noch Arabinose enthalten ist. Auf 18 bis 20 Xylosemoleküle soll 1 Arabinosemolekül kommen (2).

Außer Xylan wurde aus einigen Pflanzencellulosen ein Mannan isoliert. Die Zusammensetzung dieses Mannans ist aber noch unbekannt.

Bei den eben genannten Cellulosanen handelt es sich um Stoffe, die in engster Bindung in einer Menge von durchschnittlich 20 % mit der genuinen Cellulose vorkommen. Man glaubt sogar, daß Xylan und Cellulose in der Pflanzenzelle eine einheitliche Verbindung darstellen und daß die reine isolierte Cellulose nur ein Kunstprodukt ist.

3. *Stärke.*

Die übrigen pflanzlichen Polysaccharide, die sich nur aus einem Baustein zusammensetzen, haben im Gegensatz zu den eben genannten, die hauptsächlich statisch-mechanische Aufgaben in der Zelle erfüllen, mehr die Bedeutung von Reservestoffen.

Das bekannteste Polysaccharid dieser Gruppe ist die Stärke. Über ihre Struktur besteht noch nicht die Einigkeit wie bei der Cellulose. Allgemein anerkannt ist nur, daß es sich bei ihren Bausteinen um β-Maltose handelt. Die Kettenlänge ist noch umstritten. Amylopektin und Amylose, die beiden Bestandteile der Stärke, sollen sich nur durch ihren Gehalt an Phosphorsäureestern unterscheiden. Das eigentliche Polysaccharid soll bei beiden völlig gleich sein (3).

4. *Inuline.*

Ein weiteres Reservepolysaccharid — das Inulin — kommt bei Kompositen vor. Es besteht aus einer Kette von Fruktofuranoseresten, die in 1- und 2-Stellung gebunden sind. Über die Länge der Kette ist man sich noch nicht einig. Man vermutet zwischen 25 und 40 Bausteinen (4).

5. Mannan.

Von Baker und Pope (5) wurde aus der Steinnuß, Phytelepas macrocarpa, und der Dattelpalme ein Mannan als eine Reservesubstanz gefunden. Durch Behandlung mit kalter Natronlauge geht das Polysaccharid in Lösung. Heß und Lüdtke (6) zeigten, daß es zwei Formen von Mannan gibt. Mannan A löst sich in kalter 5-proz. NaOH und Mannan B nur in 10-proz. NaOH. Kupferammoniaklösung löst nur Mannan A. Die Kettenlänge wurde von Klages (7) auf 71 bis 86 Mannoseeinheiten veranschlagt. Die Bindung soll ähnlich wie die Glukosebindung in der Cellulose sein.

Eine ähnliche Zusammensetzung wie das eben erwähnte Mannan soll das Polysaccharid des Mucilago salep haben, das als Reservesubstanz bei verschiedenen Orchideen vorkommt. Es besteht aus einer Kette von 1.4-Anhydromannose mit einem Molekulargewicht von etwa 1200 (8).

6. Fukoidin und Agar-Agar.

Weitere Polysaccharide, die nur aus einem Baustein bestehen, kommen in Meeresalgen vor. Diese Algen enthalten zwei in Wasser stark quellende Polysaccharide. Das erste ist mit Wasser oder verdünnter Säure in der Kälte extrahierbar und wird Fukoidin oder Fukosan genannt. Das Polysaccharid besteht nur aus Fukosemolekülen, die mit jeweils ein oder zwei Molekülen Schwefelsäure verestert sind.

Das zweite Polysaccharid aus Meeresalgen kann durch verdünnte Lauge extrahiert werden und wird durch Säure wieder ausgefällt. Es besteht aus einer Kette von d-Mannuronsäuremolekülen von unbekannter Länge und Verknüpfungsart. Das Vorkommen von Mannuronsäure ist bis jetzt bei noch keinem anderen Polysaccharid beobachtet worden.

Agar-Agar ist das Polysaccharid aus der Meeresalge Gelidium. Die Art seiner Bausteine steht noch nicht endgültig fest. Die meisten Autoren glauben, daß es sich um ein verestertes Galaktan handelt (9).

Es wurden noch aus zahlreichen anderen Pflanzen Polysaccharide isoliert, die aus Fruktose, Mannose und Galaktose bestehen. Hier sollten nur die einzelnen Typen an Beispielen gezeigt werden. Die näheren Einzelheiten sind in den Handbüchern der pflanzlichen Polysaccharide zu finden.

II. Die komplexen pflanzlichen Polysaccharide

1. Hemicellulosen.

Die sogen. Hemicellulosen wurden 1892 von Schultze so genannt, weil er glaubte, daß es sich um Vorstufen der Cellulose handele. Diese Theorie hat aber an Wahrscheinlichkeit sehr stark eingebüßt, denn die Hemicellulosen bestehen aus ganz anderen Bausteinen als die Cellulose. Es gibt zwei Hauptgruppen von Hemicellulosen. Die erste ist die sogen. Glukosegruppe. Sie enthält an Bausteinen d-Glukose, d-Glukuronsäure und d-Xylose. Die zweite ist die sogen. Galaktosegruppe und enthält d-Galaktose, d-Galakturonsäure und l-Arabinose.

Hemicellulosen werden solche Zell-Polysaccharide genannt, die mit heißem oder kaltem Alkali in Lösung gehen. Eine derartige Definition ist natürlich höchst ungenau. Diese und die folgenden Polysaccharide sollen aber gerade zeigen, wie schwierig schon die Abgrenzung von einzelnen Polysaccharidindividuen aus der Pflanzenwelt ist, und mit welcher Vorsicht exakte Angaben über die tierischen Polysaccharide betrachtet werden müssen.

Es zeigt sich hier und in den folgenden Kapiteln, wie nötig noch Methoden sind, die eine einwandfreie Charakterisierung und vor allem den Vergleich von mehreren auf den verschiedensten Wegen gewonnenen Polysaccharid-Präparaten auf ihre Gleichheit zulassen.

2. Pektin.

Einige Ähnlichkeiten in der chemischen Zusammensetzung mit den Hemicellulosen weist ein anderer Baustein der Pflanzenzelle auf, das Pektin.

„Es kommt als Gerüst-, Kitt- und Stützsubstanz der Zellmembranen hauptsächlich fleischiger Früchte vor" (Ehrlich). In kaltem und heißem Wasser ist Pektin völlig unlöslich. Erst nach einstündigem Kochen mit heißem Wasser geht es in Lösung.

Aus diesen wenigen Angaben kann man schon sehen, daß das erhaltene Produkt von dem ursprünglich in der Zelle vorliegenden Zustande sicherlich Abweichungen zeigt. Die Meinungen über die chemische Zusammensetzung des Pektins sind entsprechend verschieden.

Nach Ehrlich wäre das in fester Form an den Zellwandungen der Pflanze abgelagerte „wandständige" Pektin als das genuine

Pektin zu bezeichnen. Durch langdauerndes Kochen wird es in das sogen. Hydratopektin übergeführt. Dieses Hydratopektin soll zu 20—30 % aus Araban und zu 70—80 % aus dem Calcium-Magnesiumsalz der rechtsdrehenden Pektinsäure bestehen.

Die Pektinsäure hat nach Ehrlich die Bruttoformel $C_{41}H_{60}O_{36}$ und zerfällt bei Hydrolyse nach folgende Gleichung:

$$C_{41}H_{60}O_{36} + 9\,H_2O = 4\,\underset{\text{d-Galakturonsäure}}{C_6H_{10}O_7} + 2\,CH_3OH + 2\,CH_3COOH + \underset{\text{Arabinose}}{C_5H_{10}O_5} + \underset{\text{Galaktose}}{C_6H_{12}O_6}$$

Diese primäre Pektinsäure wäre also als eine Dimethoxy-diacetyl-arabino-galakto-tetragalakturonsäure aufzufassen. Ehrlich glaubt, daß die in der Pektinsäure enthaltene Tetragalakturonsäure in Ringform vorliegt. Er nennt sie Pektolsäure.
Durch Öffnen des Ringes soll aus dieser Pektolsäure die Pektolaktonsäure entstehen, die im Gegensatz zur Pektolsäure wasserlöslich ist und stark reduzierend wirken soll.

Nach Nanji, Paton und Link (10) besteht die Pektinsäure aus einem Sechserring, der aus 4 Molekülen Galakturonsäure und je 1 Molekül Arabinose bestehen soll.

Nach Link (11) soll eine Säure, die Ähnlichkeit hat mit Ehrlich's Pektolsäure, aus einer 6—8 gliedrigen Kette von Methylgalakturonsäureestern bestehen.

Schneider und Bock (12) glauben nun im Gegensatz zu den bis jetzt genannten Autoren, daß das Pektin aus einem ähnlich großen Molekül besteht wie Cellulose. Sie behaupten fernerhin, daß das Pektinmolekül „aus mehr oder minder methylierten Galakturonsäureketten besteht, die in genetischem Zusammenhang mit den sie begleitenden Pentosan- und Hexosanketten stehen". Arabinose und Galaktose sind nach Schneider und Bock nur Verunreinigungen des Pektins. Im übrigen sollen im Pektinmolekül keine Azethylgruppen enthalten sein. Bei den von früheren Autoren festgestellten Azethylgruppen soll es sich um Verwechslung mit Ameisensäure handeln, die durch Zerstörung der Galakturonsäure entsteht.

Es muß hier allerdings darauf hingewiesen werden, daß Ehrlich (13) ausdrücklich auf die Möglichkeit der Entstehung von Ameisensäure aus Galakturonsäure hinweist und angibt, wie man Fehler durch sie bei der Essigsäure-Isolation vermeidet.

Schneider glaubt, daß es sich bei dem Pektin um ein Makromolekül mit einem Atomgewicht von etwa 180 000 handelt. Er

gewann diesen Wert durch Viskositätsmessung des Nitropektins in Aceton.

Man sieht also, daß sich in der Frage der chemischen Zusammensetzung und Struktur des Pektins noch die verschiedensten Meinungen gegenüberstehen. Da das Pektin zwei ausgeprägte biologische Wirkungen besitzt, nämlich eine blutstillende und eine antidiarrhoische, wäre es sehr wichtig, über seine Konstitution Aufklärung zu gewinnen, um seinen Wirkungsmechanismus erklären zu können. (14).

3. *Die Pflanzengummen.*

Die Pflanzengummen und Schleime sind deshalb besonders wichtig und interessant für uns, weil manche der in Bakterien gefundenen Antigen-Polysaccharide große Ähnlichkeit mit ihnen besitzen sollen. Aus diesem Grunde werden die Gummen hier etwas ausführlicher geschildert.

Die Frage, ob die Pflanzengummen und Schleime ständig vorkommende physiologische Stoffe der Pflanzen sind, oder ob sie nur pathologische Produkte darstellen, wie E h r l i c h u. A. meinen, sei hier nicht erörtert. Die Gummen erhält man jedenfalls meist nach Verletzung der Rinde oder nach ihrer Extraktion in ziemlich gleichmäßiger Zusammensetzung bei den einzelnen Pflanzenarten. Die Schleime werden meist aus den Samen extrahiert.

Die Gummen haben eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Pektin, da sie aus einem schwer aufspaltbaren Hexuronsäurekern bestehen, der von einem leichter abspaltbaren Zucker umgeben ist. Im Gegensatz zum Pektin ist ihr Hexuronsäuregehalt aber meist viel niedriger.

a) G u m m i a r a b i c u m.

Das bekannteste Gummi ist das arabische Gummi, das aus verschiedenen Akazienarten gewonnen wird. Gummi arabicum soll in der Natur als Salz vorkommen und kann als freie Säure durch Lösen in warmem Wasser gewonnen werden.

Die Säure ist einbasig. Dissoziationskonstante $2{,}0 \times 10^{-4}$. In 1%iger Lösung ist das pH = 2,7. Die Viskosität ist eine Funktion des pH. Am höchsten ist sie beim pH 5—9. Das Äquivalentgewicht ist 1000—1200. — Nach 20-stündiger Hydrolyse mit 2 % iger Schwefelsäure wurden erhalten:

28,3 % Aldobionsäure
29,5 % Galaktose
34,4 % Arabinose
14,2 % Rhamnose.

Diese Mengen entsprechen:

1 Einheit Aldobionsäure
2 Einheiten Galaktose
3 Einheiten Arabinose
1 Einheit Methylpentose.

Die Gummi arabicum-Arten verschiedener Pflanzen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung voneinander.

b) Mesquite-Gummi.

Ein anderes Gummi ist das Mesquite-Gummi aus Prosopis juliflora. Es wurden folgende Bausteine in ihm gefunden:
Arabinose, Galaktose und Glukuronsäure. Das Molekül dieses Gummi soll bestehen aus 4 Einheiten Arabinose, 3 Einheiten d-Galaktose und 1 Einheit Methoxy-d-Glukuronsäure.

c) Gummi Tragacanth.

Gummi Tragacanth aus Astragus in Griechenland und Türkei besteht teils aus löslichen, teils aus unlöslichen Bestandteilen. Der lösliche Bestandteil enthält bis zu 50 % an Uronsäuren. Außerdem sind in ihm nur Arabinose und keine Galaktose enthalten. Ein Teil der Arabinose wird durch Hydrolyse mit 3 % iger Schwefelsäure bei 100° C. schon nach 30 Minuten entfernt. Ein anderer Teil des Gummis bildet einen schwer hydrolysierbaren Kern mit einem Arabinose- und vier Uronsäuremolekülen.

d) Cholla-Gummi.

Cholla-Gummi aus Cholla cactus Opuntia fulgida in Südwest-U.S.A. besteht ebenfalls aus einer löslichen und einer unlöslichen Fraktion.

e) Kirschgummi.

Als letztes Gummi soll noch die Zusammensetzung des Kirschgummis gegeben werden. Sein Molekulargewicht wird auf mindestens 3468 veranschlagt.

Es soll aus folgenden Molekülen bestehen: 2 Glukuronsäure
3 Mannose
6 Galaktose
6 Xylose
8 Arabinose

4. Die Pflanzenschleime.

Gewisse chemische Ähnlichkeiten mit den Gummen haben manche Pflanzenschleime.

Nach Neville (16) enthält der Schleim aus Leinsamen Glukose, Galaktose, Arabinose und Xylose. Nach neueren Untersuchungen von Norris und Marschall ist das Polysaccharid des Leinsamens ganz ähnlich dem gleich zu erwähnenden Flachssamen-Polysaccharid. Das Leinsamen-Polysaccharid ist besonders interessant, da es in der Pflanze an Cellulose gebunden vorkommt. Durch diese Bindung wird die Cellulose wasserlöslich, während sie nach Abspaltung vom Schleim die gleichen Eigenschaften wie die gewöhnliche Pflanzencellulose zeigt. Aus dem Leinsamen-Schleim konnte Arabinose, Galaktose, Rhamnose und Galakturonsäure identifiziert werden. Die Arabinose ist, wie meist, leicht abspaltbar und läßt einen Restkomplex zurück.

Anderson und Crowler (17) isolierten nach einer 20-stündigen Hydrolyse mit 4%iger Schwefelsäure aus Flachssamen eine Aldobionsäure, die aus Galakturonsäure und l-Rhamnose bestand. Es wurde außerdem l-Galaktose, die sonst in der Natur nicht vorkommt, und d-Xylose gewonnen.

Nieman und Link (18) untersuchten deshalb die Galakturonsäure und fanden, daß es sich im Gegensatz zur l-Galaktose um d-Galakturonsäure handelt.

III. Die einfachen tierischen Polysaccharide

1. Glykogen.

Am längsten bekannt und am meisten untersucht, allerdings hauptsächlich im Rahmen des Stoffwechsels, ist das Glykogen.

In seiner chemischen Zusammensetzung soll es der Stärke weitgehend ähneln. Man kann durch Hydrolyse und biologischen Abbau die gleiche Maltose und Glukose wie bei der Stärke erhalten. Ob aber der strukturelle Feinbau des Glykogens mit dem der Stärke übereinstimmt, ist unseres Wissens noch nicht bewiesen. Molekulargewichts-Bestimmungen (20) ergaben einen Wert von etwa 114 000.

Obwohl das Glykogen von höchstem Interesse und Wichtigkeit im Stoffwechselgeschehen ist, sind seine chemischen Probleme doch keineswegs gelöst. Wenn auch der Beweis der Identität oder der Verschiedenheit des Glykogens mit Stärke mehr theoretische Bedeutung hat, so wäre der Beweis des Vorkommens verschiedener Glykogenarten im gleichen Körper und auch der Unterschied der Glykogene verschiedener Tierarten von großer praktischer Bedeutung.

Die ersten, die die Behauptung von der Verschiedenartigkeit des Glykogens aufstellten, waren B ö h m und H o f f m a n n (21). Sie glaubten, daß sich das Glykogen der Leber und der Muskeln unterscheide und führten als Beweis dafür Unterschiede in der Opaleszenz und in Farbenreaktionen an. Nun genügen diese Unterschiede natürlich noch nicht. Schon geringe Beimengungen und andersartiges Ausgangsmaterial können Unterschiede vortäuschen, die nicht vorhanden sind.

Andere Untersucher haben das Vorhandensein von mehreren Glykogenarten durch das wechselnde Verhalten gegenüber biologischen Einwirkungen zu beweisen versucht. Bei diesem Problem müssen aber auch noch die anderen Hilfsmittel der modernen Polysaccharidchemie eingesetzt werden.

2. *Fruktogen.*

Während also einerseits die Möglichkeit besteht, daß aus Glukose aufgebautes Glykogen sich in seinem Feinbau unterscheidet, wird weiterhin behauptet, daß es „Glykogen" gibt, das aus Fruktose und Galaktose aufgebaut ist.

Man zieht für die Existenz des Fruktogens hauptsächlich die Tatsache heran, daß Diabetiker Fruktose leichter und besser verwerten können als Glukose und aus ihr auch Glykogen zu bilden in der Lage sind. S t e i n b e r g und E l b e r g (22) glauben, daß zum Aufbau des Fruktogens die Pankreas nicht nötig ist.

Noch zahlreiche Arbeiten sind über dieses Problem, das für die Behandlung des Diabetes von besonderer Wichtigkeit ist, erschienen. Hier soll aber nur auf das Vorliegen des chemischen Problems hingewiesen werden.

3. Galaktogen.

May (23) hat sich in verschiedenen Veröffentlichungen mit dem Galaktogen beschäftigt, das er aus den Geschlechtsorganen von Fröschen und Schnecken isolieren konnte. Es setzt sich aus β-Galaktose zusammen. Als spezifische Wirkung der β-Galaktose konnte er übrigens bei pflanzlichen Keimen Wuchssteigerung beobachten.

IV. Die komplexen tierischen Polysaccharide

Bei den komplexen tierischen Polysacchariden werden die Verhältnisse besonders schwierig. So steht es noch nicht fest, ob es sich wirklich um Polysaccharide handelt, also um Kohlehydrate, die aus zahlreichen Einzelbausteinen aufgebaut sind. Man kennt in den allermeisten Fällen nur die Hydrolysenbruchstücke. Über Kettenlängen sind noch wenig Versuche gemacht worden. Eine zweite Besonderheit der jetzt zu besprechenden Polysaccharide ist die, daß sie fast sämtlich an Eiweiß gebunden vorkommen.

Handelt es sich nun nur um Eiweißbausteine, um die Betrachtung willkürlicher Hydrolysenbruchstücke eines größeren Moleküls, oder sind diese Polysaccharide Individualitäten, die nur durch einfache Adsorptionsbindungen einem an sich indifferenten einheitlichen Eiweißgrundkörper bestimmte, je nach dem Polysaccharid verschiedene Eigenschaften und Wirkungen verleihen?

1. Mukoide.

a) Mukoitin-Schwefelsäure.

Aus zahlreichen Organen und auch aus Blut wurden schon vor längerer Zeit stark kohlehydrathaltige Eiweißkörper isoliert: die tierischen Schleime, Mukoide oder Mukoproteine.

Mit den Mukoiden beschäftigte sich von den älteren Autoren vor allem Levene (24). Der Kohlehydratkomplex dieser Mukoide, die

den tierischen Schleimen die besonderen physikalischen Eigenschaften verleihen, besteht nach Levene zum großen Teil aus Mukoitinschwefelsäure.

b) Chondroitin-Schwefelsäure.

Einen ganz ähnlichen Aufbau ihres Kohlehydratkomplexes zeigen die Eiweißkörper des Knorpels, der Sehnen und elastischen Fasern.

Nicht alle Kohlehydratkomplexe sind so aufgebaut wie die eben genannten. Schulz und Becker (25) konnten z. B. aus der Schleimdrüse von Rana esculenta ein Glykoproteid isolieren, das zu 28,5 % aus einem Polysaccharid bestand. Sie konnten zeigen, daß sich dieses Polysaccharid aus 50 % Glukosamin und aus 50 % Galaktose zusammensetzt. Über die Kettenlängen machen die Untersucher keine Angaben.

Masamune und Hagine (26) untersuchten Ovomukoid und fanden einen Polysaccharidgehalt von rund 20 %. Ihr isoliertes Polysaccharid zerfiel bei Hydrolyse in gleiche Teile Glukosamin und Mannose.

c) Mukoid des Magensaftes.

Eine Reihe von Untersuchungen an verschiedenen Mucinen führten Meyer und Palmer (27) aus. Im Mucin der Magenschleimhaut des Schweines konnten sie zwei Polysaccharide nachweisen.

1. Ein neutrales aus Acetylglukosamin und Galaktose in ungefähr äquimolaren Mengen zusammengesetztes und

2. ein sauer reagierendes, das aus Azethylglukosamin, Hexuronsäure und Schwefelsäure zusammengesetzt ist. Das erstgenannte neutrale Polysaccharid ergab interessanterweise eine Blutgruppenreaktion A in einer Menge von $5—10 \cdot 10^{-10}$ g. Seine Menge ist im Magenschleim viel größer als die des sauren Polysaccharides und ist sehr wahrscheinlich für die Viskosität des Magenmucins verantwortlich zu machen.

d) Heparin.

Das Heparin zeigt in seiner Zusammensetzung eine große Ähnlichkeit mit der Levene'schen Chondroitinschwefelsäure (28). Wahrscheinlich ist aber Heparin ein Polymeres der Chondroitinschwefelsäure. Jorpes und Bergström (29) fanden eine entsprechende Verschiedenheit der Hydrolysenkurven der beiden Stoffe.

2. *Blutgruppen-Polysaccharide.*

a) Vorkommen der Gruppenstoffe.

Wir hatten schon bei einer Unterfraktion des Magenmucines des Schweines erfahren, daß dies eine Blutgruppenreaktion A ergab. Solche „Blutgruppensubstanzen" wurden außerdem noch von verschiedenen Autoren aus zahlreichen Drüsen und Körpersäften isoliert. So konnten Freudenberg und Eichel (30) aus 1000 Liter Menschenharn der Blutgruppe A ein Polysaccharid darstellen, das ebenfalls die Blutgruppen-A-Reaktion ergab. Eichel befaßte sich in seiner Dissertation noch eingehender mit diesen Stoffen.

Auch im Speichel wurden mehrfach Verbindungen nachgewiesen, die die entsprechenden Blutgruppenmerkmale ihrer Träger aufwiesen. Tasiro (31), der die Verhältnisse des Speichels untersuchte, kommt zu folgenden Ergebnissen: Die Speicheldrüsen von Menschen der A-, B- und AB-Gruppe enthalten eine gruppenspezifische Substanz, welche bei der Isohämagglutination gruppenspezifisch hemmend wirkt. Am meisten Gruppensubstanz enthalten die Sublingualdrüsen. Hier wiederum sind es nur die mukösen Zellen, die den Gruppenstoff bilden. Tasiro glaubt deshalb auch, daß der Kohlehydratkomplex der Mukoide die Reaktion ergibt.

Es stellt sich nun die Frage, ob auch die Blutkörperchen selbst den gleichen Gruppenstoff enthalten, oder ob die isolierten Polysaccharide aus anderen Säften und Organen nur zufällig die gleiche Reaktion ergeben wie die möglicherweise chemisch ganz anders gearteten echten Blutkörperchen-Gruppenstoffe. Wie sich aber herausgestellt hat, sind die aus Blutkörperchen gewonnenen Gruppenstoffe identisch mit den aus anderen Quellen isolierten. Schon Hallauer (32) konnte dies wahrscheinlich machen. Hallauer untersuchte die Blutgruppen O, A und B und gewann aus Voll-Erythrozyten und Stromata wasserlösliche Gruppenstoffe, die in folgenden Mengen die Isohämagglutination spezifisch hemmten:

								Gamma
Stoff	A	aus	Voll-Erythr.		in	einer	Menge	von 2,5
„	B	„	„		„	„	„	„ 1,0
„	A	„	Stromata		„	„	„	„ 0,5
„	B	„	„		„	„	„	„ 0,25

Hallauer, der auch aus O-Erythrozyten und Stromata in entsprechender Menge wie bei A und B je einen wasserlöslichen Stoff gewinnen konnte, zeigte, daß auch diesem eine gruppenspezifische

Wirkung zukommt, die nur im allgemeinen nicht nachzuweisen ist, da das menschliche Serum keine Anti-O-Stoffe enthält. Manche Rinderseren enthalten dagegen einen Anti-O-Stoff. Mit diesen Seren wies Hallauer nach, daß auch der O-Stoff in einer Menge von 1,0 γ typenspezifisch hemmend wirkt. Über die daraus zu ziehenden Erkenntnisse über den „Sinn" der Blutgruppenreaktionen soll bei der verwandten Problemstellung der Bakterien-Antigene gesprochen werden.

b) Chemie der Gruppenstoffe.

Genaue Werte über die chemische Zusamensetzung liegen noch nicht vor. Der Gruppenstoff A soll an Bausteinen Azetylglukosamin, Galaktose und nach einigen Untersuchungen auch Uronsäure enthalten. Optische Drehung $\alpha D = +10^0$. Das Molekulargewicht ist noch nicht sicher bestimmt. Die aus den Blutkörperchen gewonnenen Stoffe sind nach Hallauer in Wasser leicht löslich, in Alkohol, Äther, Azeton und kaltem Benzol unlöslich. Sämtliche Eiweißproben sind negativ. Nach 1-stündiger Hydrolyse mit 2 normaler Salzsäure einer 1 % igen Lösung der Substanz erhielt Hallauer für A, B und O gleich stark folgende Reaktionen:

Mol. Naphtalprobe:	positiv
Phlorogluzinprobe:	stark positiv
Bial'sche Probe:	stark positiv
Resorcinprobe:	negativ
Reduktion Fehl. Lösg.:	vorhanden
Gärung:	negativ.

Die Elementaranalyse ergab nach Hallauer;

	%C	%H	%N	%P	%S
O	43,35	7,08	7,98	16,89	2,47
A	43,15	8,36	6,88	15,05	2,14
B	46,25	7,00	7,40	21,85	3.96

3. *Eiweißzucker des Blutes.*

a) Geschichte.

Die Bezeichnung „Eiweißzucker des Blutes" ist jetzt eigentlich überholt. Wir sahen ja schon, daß die verschiedensten Polysaccharide an Eiweiß gebunden vorkommen.

Bei dem sogen. „Bluteiweißzucker" soll es sich nicht um das Serummukoid Polysaccharid, auch nicht um die Polysaccharide des Blutgruppenstoffes handeln, sondern um eine Kohlehydratgruppe des Albumins und vor allem des Globulins des Serums, die mit den vorher erwähnten Zuckern gewisse chemische Ähnlichkeiten besitzt.

Um die Existenz eines solchen Polysaccharides war fast ein halbes Jahrhundert Streit zwischen den einzelnen Untersuchern. Man bestimmte den angenommenen, aber nicht isolierten Zucker durch die Differenz des Reduktionsvermögens des Blutserums vor und nach Hydrolyse mit verdünnter Säure, wobei man je nach Dauer der Hydrolyse, Temperatur, Art und Konzentration der Säure, die verschiedensten Resultate erhielt. Eine Literaturzusammenfassung dieser Periode hat Grevenstuck in seinem Buch über den freien und gebundenen Zucker des Blutes gegeben.

Lauersen (33) hat dann darauf hingewiesen, wie unnütz der Vergleich, der unter den verschiedensten Bedingungen gewonnenen Werte für den Eiweißzucker des Blutes ist und hat versucht, durch Aufstellung von durch fraktionierte Hydrolyse gewonnenen Kurven diese Differenzen zu klären.

Bei diesen Hydrolysen-Methoden werden aber sämtliche Polysaccharide des Serums, wie Glykogen, Mukoide usw. erfaßt. Aus diesem Grunde erhält man nur ein komplexes Bild.

Nachdem der Eiweißzucker isoliert worden ist, hat man sich nach Methoden umgesehen, die nur dieses Polysaccharid bestimmen.

b) Vorkommen des Eiweißzuckers.

Fränkel und Jellinek (34) stellten 1927 aus Eieralbumin ein Polysaccharid dar, das bei Hydrolyse wie das Ovomukoid Polysaccharid in Mannose und Glukosamin zerfiel. Im Gegensatz zum Ovomukoid ist aber der Gehalt des Eieralbumins an diesem Polysaccharid viel geringer. Es kommen außerdem auf einen Teil Glukosamin 2 Teile Mannose. Dische (35) zeigte, daß dieses Polysaccharid auch im Pferdeblut vorkommt. Rimington (36) stellte fest, daß diese Glukosamin-Dimannose im Globulin in einer Menge von 3,7 % enthalten ist. Bierry (37) findet ähnliche Werte der Menge nach. Er behauptet allerdings, daß das aus Pferdeserum hergestellte Polysaccharid aus je einem Teil d-Mannose, d-Galaktose und d-Glukosamin besteht.

Die Untersuchungen aus dieser Zeit (1928—32) leiden aber noch unter 2 Nachteilen:

1. Es ist nach der Herstellungsart nicht ausgeschlossen, daß die erhaltenen Polysaccharide verschiedenen Eiweißfraktionen entstammen. Die damaligen Untersucher nahmen meist an, daß nur ein Polysaccharid an die Bluteiweißkörper gebunden vorkommt.

2. Die Darstellungsmethoden sind noch ziemlich eingreifend, so daß die Möglichkeit von Veränderungen während der Isolation durchaus gegeben ist.

Während man also früher annahm, daß nur 1 Polysaccharid an Globulin gebunden vorkommt, glaubt man jetzt, daß neben den schon erwähnten Mukoid- und Blutgruppen- Polysacchariden noch Unterfraktionen des Globulins und Albumins verschiedene Polysaccharide in verschieden großer Menge enthalten.

Hewitt und Frank (38) beschäftigten sich mit der Fraktionierung der Eiweißgruppen. Nach ihnen enthält Pferdeserum 3,6 % Globulin mit etwa 3 % Polysaccharidgehalt, 2,8 % Kristalbumin mit ganz wenig Polysaccharidgehalt, 0,3 % eines Glykoproteins mit einem Polysaccharidgehalt von 9,5 % und 0,05 % Serummukoid mit einem Gehalt von 30 % Polysaccharid.

Auch Nilsson (39) beschäftigte sich mit diesem Problem. Wenn die Eiweißpolysaccharide hauptsächlich an die Globuline gebunden sind, muß der Anstieg dieser Polysaccharide auch dem Anstieg der Globuline parallel gehen. Nilsson untersuchte deshalb die Veränderungen des Globulins und Eiweißzuckergehaltes bei Pneumonien und fand, daß der Eiweißzucker prozentual weit mehr anstieg, als der Globulingehalt. Er kommt deshalb zum Schluß, daß eine besonders stark polysaccharidhaltige Fraktion vorhanden sein müsse, die außerdem bei pathologischen Zuständen stark ansteige.

Damit kommen wir nun zu der Frage der Bedeutung dieser Eiweißzucker. Schon im vorhergehenden Abschnitt haben wir gesehen, daß die Mukoide auf Grund ihres Kohlehydratgehaltes besondere physikalische Eigenschaften erhalten, daß die mit den Mukoiden eng verwandten Blutgruppenstoffe höchstdifferente Wirkungen entfalten. Sind nun auch die anderen Eiweißzucker besonderer Wirkungen fähig? Verleihen auch sie dem indifferenten Eiweißgrundkörper besondere Eigenschaften? Um diesen Fragen näherzukommen, untersuchte man die Menge des vorhandenen Blutzuckers bei den verschiedensten Krankheiten.

c) Bestimmung des Eiweißzuckers.

Die Hydrolyse und nachträgliche Bestimmung des Reduktionszuwachses ist als Mengenbestimmungsmethode von den meisten Forschern aus den schon weiter oben erwähnten Gründen verlassen

worden. Die nächsten Untersucher bedienten sich der Methode nach Tillmanns und Philippi (40). Das Prinzip der Methode ist folgendes: Die Eiweißkörper des Serums werden ausgefällt, von wasser- und alkohollöslichen Substanzen befreit, dann wieder gelöst, mit einer Orcinlösung in 30 % iger Schwefelsäure versetzt, erhitzt und mit einer ebenso behandelten Glukose-Vergleichslösung kolorimetriert. Diese Methode ist noch sehr ungenau. Glukose gibt eine andere Färbung als Mannose und Galaktose. Bei der Orcinreaktion ist außerdem die einfache kolorimetrische Ablesung nicht gut geeignet.

Sörensen (41) gab deshalb eine Verbesserung der Methode an. Sie verwendete zur Ablesung das Stufenphotometer und bereitete eine Vergleichslösung, die aus Mannose und Galaktose bestand.

Andere Untersucher, wie Nilsson, bestimmten den Glukosamingehalt der Serumproben, da ja im Eiweißzucker auch 1 Teil Glukosamin enthalten ist. Über die Brauchbarkeit der Glukosamin-Bestimmungsmethoden in Gegenwart von Eiweiß gehen die Meinungen noch stark auseinander.

Die meisten Untersucher benutzten deshalb die Tillmanns-Philippi'sche Methode mit mehr oder weniger Abänderungen. Wenn auch bei der kolorimetrischen Methode weniger Polysaccharide erfaßt werden als bei der Reduktionsbestimmung nach Hydrolyse, so werden doch die vorhandenen verschiedenen Eiweißzuckerfraktionen nicht getrennt erfaßt. Daran muß man bei der Betrachtung der folgenden Befunde denken.

d) Die Pathologie des Eiweißzuckers.

Lustig und Langer (42) fanden in 73 Normalfällen einen Eiweißzuckergehalt zwischen 77—156 mg %. Bei Diabetikern beobachteten sie 16 normale Werte, obwohl in 6 dieser Fälle der freie Blutzucker bis zu einem Wert von 350 mg % angestiegen war. Diese Befunde sind von verschiedenen Seiten, so vor allem Japanern, bestätigt worden. Auch auf Insulingaben verändert sich der Eiweißzuckergehalt nicht. Mit dem gewöhnlichen Kohlehydratstoffwechsel im energetischen Sinne hat also der Eiweißzucker allem Anschein nach nichts zu tun.

Starke Erhöhungen des Eiweißzuckers fanden sich dagegen bei Infektionserkrankungen und Tumoren. Lustig und Langer bestimmten so bei Fieber 234 mg %, bei Furunkulose 179—270 mg %, bei Tb-Erkrankungen mit geringem Fieber 330 mg %. Bei höherem Fieber waren die Werte manchmal niedriger. Bei Pneumonien fanden sich 274 mg %, bei Carcinom bis zu 322 mg %. Diese Befunde

stimmen mit denen von Bierry (43) überein, der bei Krebs mit Metastasen und Kachexie eine 4-fache Erhöhung des Normalwertes feststellte. Auch bei Lungen-Tb. und chronischen Nephritiden fand Bierry erhöhte Werte.

Bei Basedow fanden Lustig und Langer normale Werte.

e) Bedeutung der Eiweißzucker.

Aus den bis jetzt gefundenen Ergebnissen kann man schon einiges über die Bedeutung der Eiweißzucker aussagen. Es scheint, als seien die Eiweißpolysaccharide am Stoffwechsel und den hormonalen Vorgängen weniger beteiligt. Andere Eiweißzucker, wie die Blutgruppenpolysaccharide, verkörpern Arteigenschaften. Diese Eigenschaften treten beim Zusammenstoß mit gruppenfremden Verbindungen in Erscheinung. Es liegt deshalb nahe anzunehmen, daß die Eiweißpolysaccharide bei dem Zusammentreffen mit den Bakterien, den kranken und andersartigen Zellen der Tumoren irgendeine Rolle spielen. Welche Rolle sie allerdings dabei spielen, ist durchaus noch nicht geklärt. Es ist sicherlich verfrüht, sie mit den Antikörpern in Verbindung zu bringen, wie es manche Autoren tun.

Um hier weiterzukommen, müssen die Eiweißkörper vor allem schonend fraktioniert werden. Es wird immer deutlicher, daß es mehrere physikalisch trennbare Globulinfraktionen gibt, auch wenn man mit dem Verfahren der einfachen Hydrolyse und nachträglichen Bestimmung der Spaltprodukte gleiche Werte erhält.

Es gibt folgende Möglichkeiten, die Verschiedenartigkeit der Globulinfraktionen zu erklären: Entweder sind die Eiweißkörper der einzelnen Fraktionen gleich und die Verschiedenheit wird nur durch das jeweils andere Polysaccharid bedingt, oder aber beide Körper — Eiweiß und Polysaccharid — sind verschieden, oder aber das Polysaccharid ist jeweils dasselbe und das Eiweiß ist allein verschiedenartig zusammengesetzt.

Gegen die letzte Möglichkeit sprechen die schon erhaltenen Befunde, die ja bei einzelnen Serum-Eiweiß-Fraktionen verschiedene Polysaccharidwerte fanden. Die ersten beiden Möglichkeiten sind also die wahrscheinlicheren. Um die angeschnittenen Fragen zu klären, müssen die Polysaccharide schonend vom Eiweißmolekül getrennt werden und die verschiedenen Polysaccharide müssen wieder mit einheitlichen Eiweißmolekülen verbunden werden. Erhält man dann Körper, die sowohl physikalisch als auch in biologischer Hinsicht sich mit den ursprünglichen gleichen, so kann man wohl sagen, daß nur das Polysaccharid die besonderen Eigenschaften bestimmt.

Diese Methode hat man schon mit großem Erfolg bei den Antigen-Polysacchariden der Bakterien angewandt, die später beschrieben werden soll.

Um sicher zu sein, daß man die Polysaccharide bei ihrer Isolation nicht verändert hat, muß man Polysaccharide, die vom gleichen Ausgangsmaterial auf verschiedenem Wege gewonnen wurden, auf die Gleichheit ihres strukturellen Feinbaues prüfen können.

Unsere im Teil B geschilderte Methode soll es ermöglichen, diese Fragen zu klären.

4. Die Antigen-Polysaccharide der Bakterien.

Die Antigen-Polysaccharide der Bakterien gehören, was ihre physiologische Wirkung anbetrifft, zweifellos zu den interessantesten Verbindungen.

Man wußte schon längere Zeit, daß beim Aufbau der Bakterien Kohlehydrate einen beträchtlichen Anteil haben. Besondere und noch immer steigende Aufmerksamkeit wird ihnen aber erst geschenkt, seit man ihre Bedeutung als Antigene erkannt hat.

Aus diesem Grunde soll hier auch die Bedeutung der Polysaccharide stärker betrachtet werden, zumal wir noch in keinem Falle in der Lage sind, genauere Formelschemen wie bei den pflanzlichen Polysacchariden anzugeben.

a) Pneumokokken-Antigene.

Für die Pneumokokken konnte die Antigenwirkung ihrer Polysaccharide zuerst nachgewiesen werden. Avery und Mitarbeiter waren es vor allem, die die Verhältnisse klärten.

Man machte folgende Feststellungen: Die isolierten Polysaccharide werden von Immunseren präzipitiert. Spritzt man jedoch die Polysaccharide allein, so entsteht keine Immunität des betreffenden Tieres gegen Pneumokokken. Bindet man aber die Polysaccharide an ein beliebiges Eiweißmolekül, so erzeugen sie diese Immunität, während das Bakterieneiweiß, allein gespritzt, wirkungslos bleibt.

Es dürfte darnach erwiesen sein, daß die Kapselpolysaccharide der Pneumokokken zwar nur in Verbindung mit Eiweiß als echte Antigene wirken, aber dem an sich indifferenten Eiweißgrundkörper die charakteristische Prägung geben.

Es ist natürlich von höchstem Interesse, welchen chemischen Aufbau diese Polysaccharide haben, die so weitgehend spezifische Wir-

kungen entfalten. Mit einiger Überraschung stellte man fest, daß Bausteine gefunden wurden, die man auch bei den verschiedensten anderen tierischen und pflanzlichen Polysacchariden vorfindet, ohne daß diese besondere Wirkungen haben. Das erscheint vielleicht verwunderlich. Bei den Blutgruppenstoffen sahen wir aber schon, daß eine Substanz, die für die Viskosität des Magenschleimes verantwortlich ist und sicher im Körper auch keine andere Funktion hat, als die Herstellung eines viskosen Magenschleimes, identisch mit der Gruppensubstanz A erscheint.

Man muß bei allen diesen Erscheinungen auf den im ersten Augenblick so überzeugenden Anschein des „Zweckes" verzichten und auch die fein aufeinander abgestimmten Wirkungen von Bakterien auf den tierischen Organismus lediglich als Wirkungen des chemischen und physikalischen Charakters dieser Stoffe auf andere Stoffe im Organismus betrachten.

So haben die Polysaccharide der Bakterien sicher nicht den Zweck, als Antigene zu wirken. Sie sind einfach Bausteine oder Erzeugnisse des Bakteriums. Welchen „Sinn" soll z. B. die Blutgruppenreaktion haben, deren Mechanismus mit den Abwehrvorgängen sehr eng verwandt ist?

Die Stoffe, die im Körper die Blutgruppenreaktion bewirken, sind zweifellos nicht dazu da, sondern haben andere Funktionen im Blute zu erfüllen. Nur wenn der künstlich geschaffene Fall einer Blutübertragung eintritt, dann tritt eben zwischen zwei Stoffen mit charakteristischen Eigenschaften ein Zustand ein, der diesen Eigenschaften entspricht.

Für die eben erwähnte Anschauung spricht noch besonders die Tatsache, daß die O-Blutkörperchen scheinbar keinen Gruppenstoff besitzen. In Wirklichkeit kann man aus ihnen, wie schon weiter vorn berichtet wurde, mit der gleichen Methode, mit der man aus A-, B- und AB-Blutkörperchen die Gruppenstoffe isoliert hat, auch aus O-Körperchen eine Substanz in gleicher Menge und ähnlicher chemischer Zusammensetzung gewinnen, deren Agglutinierbarkeit aber nur beim Zusammenbringen mit einigen Rinderseren sichtbar in Erscheinung tritt.

An dieser Tatsache kann man wohl am besten erkennen, daß die Gruppenreaktionen keinen „Sinn" haben, denn warum sollten ausgerechnet O-Menschen gegen die Seren einiger Rinderstämme reagieren?

Nach dieser allgemeinen Betrachtung über die Wirkungsweise der spezifischen Polysaccharide wollen wir nun die bis jetzt gewonnenen chemischen Kenntnisse betrachten.

Eine Konstitutionsformel der Pneumokokken-Polysaccharide kann man noch nicht aufstellen. Folgende Werte sind bis jetzt bekannt: Pneumokokken-Polysaccharid Typ I $\alpha D = +277 - 300^0$ Das Aequivalentgewicht soll bei 580 liegen. N-Gehalt 4,9 —5,0 %. Galakturonsäure, Aminozucker und Essigsäure wurden als Spaltstücke gefunden. Die größte Verdünnung, in der es mit entsprechenden Seren präzipitiert, ist 1 : 6 000 000.

Aus dem Pneumokokken-Polysaccharid Typ II hat man bis jetzt erst Glukose als Spaltstück identifiziert. $\alpha D = +74^0$. Stickstoff soll nicht enthalten sein. Es präzipitiert in einer Verdünnung von 1 : 5 000 000. Aequivalentgewicht etwa 970.

Typ III und VIII enthält Aldobionsäure und Glukose. Bei der Aldobionsäure soll es sich um ein Glukose- $\beta - 4$-Glukuronid handeln (42). Die β-Bindung weist darauf hin, daß es sich um den Cellulosetyp handelt.

Diese chemischen Kenntnisse über die Pneumokokkenpolysaccharide können noch nicht befriedigen. Die Bausteine, die gefunden wurden, kommen in zahlreichen Polysacchariden, die wir in Nahrungsmitteln zu uns nehmen, vor. Wenn man auch noch berücksichtigt, daß für eine Antigenwirkung die Bindung an Eiweiß dazukommen muß, so ist doch für die besondere Wirkung dieser Polysaccharide noch keine chemische Erklärung gefunden.

Uhlenhuth (43) kuppelte z. B. Polysaccharide, die ähnliche Bausteine enthielten, wie die aus den Pneumokokken isolierten, an Eiweiß, ohne eine Antigenwirkung nachweisen zu können. Hotchkiss und Göbel (44) fanden, daß Glukuronsäure und auch Galakturonsäure-Eiweißverbindungen allerdings manchmal doch von Pneumokokkenantiseren präzipitiert werden. Aus diesem Grunde glauben sie, daß die sauren COOH-Gruppen für die Spezifität verantwortlich sind. Sie meinen, daß nur die räumliche Strukturanordnung dieser Gruppen das Wesentliche ist.

Die bekannten Versuche von Landsteiner haben ergeben, daß man diazotierte aromatische Sulfosäuren, die an Eiweiß gekuppelt sind, und sich nur durch die Stellung der SO_3H-Gruppe am Ring unterscheiden, auf Grund von Präzipitinreaktionen auseinanderhalten kann.

Wie sind nun aber die negativen Versuche Uhlenhuts zu erklären? Wenn auch die Landsteiner'schen Annahmen richtig sein können, so muß man sich doch fragen, ob nicht doch auch die Art der Verknüpfung der Polysaccharidketten eine große Rolle spielt! Einfach anzunehmen, daß nur der COOH-Gruppe der Uronsäuren

die wesentliche Rolle zukommt, heißt die Lösung des Problems sicherlich etwas zu leicht nehmen, zumal es eine ganze Reihe von Polysacchariden in Bakterien gibt, die ebenfalls Uronsäuren enthalten, mit denen aber niemals eine Antigenwirkung nachgewiesen werden konnte.

b) Tuberkel-Antigene.

Während man sich über die Bedeutung der Pneumokokken-Polysaccharide allgemein einig ist, gehen die Meinungen über die Bedeutung der anderen Bakterienpolysaccharide noch auseinander.

Besonders verwickelt liegen die Verhältnisse bei den Tuberkelpolysacchariden. Bei den Pneumokokken sind die Polysaccharide die eigentlichen Antigene. Hier, bei den Tuberkelbazillen, scheinen die Antigene aber auch noch anderer chemischer Natur zu sein. Einige Wirkungen werden den Tuberkelkohlehydraten aber doch zugeschrieben.

So untersuchte Lindner (45), auf welche chemischen Fraktionen sich die einzelnen spezifischen Wirkungen des Tuberkelbazillus verteilen. Lindner findet, daß die beiden Eigenschaften des Tb-Bazillus, nämlich erstens den frisch infizierten Körper so umzustellen, daß er bei zweiter Infektion anders reagiert und zweitens bei Tieren, die schon mit Tuberkulose infiziert waren, eine Reaktion auszulösen, auf zwei chemische Fraktionen verteilt sind.

Die erste Eigenschaft besitzt der sogen. Restkörper, der nach erschöpfender Extraktion aller Lipoidsubstanzen, wie Wachse, Fette, Phosphatide und nach Entfernung aller wasserlöslichen Eiweißkörper übrigbleibt. Lindner glaubt nun, daß wahrscheinlich das im Restkörper-Substanzgemisch in beträchtlicher Menge vorhandene Polysaccharid für die physiologische Wirkung verantwortlich zu machen ist.

Der Restkörper hat nicht die Fähigkeit, die allergische Reaktion, bzw. die Tuberkulinreaktion, bei Vorinfizierung hervorzurufen. Andererseits wirkt das Tuberkulin und die Tuberkulin tragenden Eiweißverbindungen selbst nicht umstimmend.

In der Folgezeit beschäftigte man sich noch eingehender mit den Tuberkel-Polysacchariden, konnte aber noch nicht zu einer Einigkeit gelangen. Amerikanische Autoren (46) zerlegten die Polysaccharide der Tuberkelzellen in einzelne Fraktionen. Verschiedene waren völlig unspezifisch und gaben keinerlei Reaktion. Typenspezifisch war keines der gefundenen Polysaccharide. Sie setzten

sich aus jeweils wechselnden Mengen von d-Arabinose und Mannose zusammen. Bei den genannten Polysacchariden handelt es sich um Verbindungen aus dem Inneren der Zellen. Im Wachs der Zellen wurden von anderen Autoren noch d-Galaktose und Glukosamin nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Befunden von Heidelberger fand Klopstock (47) bei seinen verschiedenen Fraktionen der Tuberkelsaccharide keinerlei spezifische Wirkungen. Er kommt deshalb zum Schluß, daß die Präparate der amerikanischen Autoren nicht genügend gereinigt waren und noch andere Substanzen enthielten. Es ist andererseits aber auch möglich, daß die von Klopstock angewandten Reinigungsmethoden zu eingreifend sind und die Feinstruktur der Polysaccharide verändern.

Gerade an Hand dieser Beispiele erkennt man, wie notwendig Methoden sind, die solche geringfügigen Veränderungen erkennen lassen, wie man sie hier zu erwarten hat.

c) Streptokokken-Antigene.

Ähnliche Unstimmigkeiten in der Beurteilung der Polysaccharide herrschen auch bei den meisten übrigen Bakterienarten vor. Während Haurowitz (48) in seiner Zusammenstellung es so hinstellt, als ob auch die Bedeutung der Polysaccharide aus Strepto-, Staphylo-, Meningokokken, der Friedländer-, Typhus-, Ruhrbazillen und der Choleravibrionen als Antigene durchaus sicherstehen, fanden z. B. Kendall und Forrest (49), daß das aus hämolytischen Streptokokken isolierte Polysaccharid, welches aus N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure besteht und für drei verschiedene Typen gleich ist, im Gegensatz zu den Pneumokokken-Polysacchariden keinerlei spezifische Wirkungen zeigt.

Das isolierte Polysaccharid soll dem aus Glaskörperflüssigkeit und Nabelschnurgallerte gewonnenen gleichen.

Der Identitätsbeweis ist jedoch noch nicht völlig gelungen.

d) Choleravibrionen-Antigene.

Lindon und Mitra (50) beschäftigten sich mit den Choleravibrionen. Sie glauben, die Anwesenheit von Uronsäuren und Galaktose nachgewiesen zu haben. Das Polysaccharid enthält 2,0 bis 3,4% N, davon 20% Amino-N, 3,8 bis 6,4% Azethyl. Bei Typ II

und III läßt sich aus den schon extrahierten Bakterien mit anderen Mitteln noch eine weitere erhebliche Menge Polysaccharid isolieren.

e) Antigene schmarotzender Würmer.

Am Ende dieses kurzen Überblicks über die Antigenpolysaccharide soll noch vermerkt werden, daß auch höhere Organismen als die Bakterien Polysaccharide hervorbringen, die als Antigene wirken. Campbell (51) berichtet, daß schmarotzende Würmer Polysaccharide enthalten, auf die die Wirte spezifische Antikörper bilden. Ascaris lumbricoides und Ascaris suum lassen sich durch die Antigenreaktionen ihrer Polysaccharide trennen, obwohl sie morphologisch kaum zu unterscheiden sind.

B. Praktischer Teil

I. Die fraktionierte Hydrolyse mit verdünnter Säure als Methode zur Charakterisierung von Polysacchariden

Bei der Besprechung der bisher isolierten pflanzlichen und tierischen Polysaccharide mußten wir immer wieder darauf hinweisen, daß zwar in den meisten Fällen die einzelnen Bausteine, die man durch Hydrolyse erhält, bekannt sind, daß aber die Kettenlänge und Konstitution nur in einigen Fällen geklärt ist. Während nun die Konstitutionsaufklärung vor allem für die Chemiker von Wichtigkeit ist, macht sich die Unmöglichkeit einer genaueren Charakterisierung der Polysaccharide, die biologisch wirksam sein sollen, sehr störend bemerkbar. Wir haben vor allem im Abschnitt über die Bakterienantigene darauf hingewiesen, welche Bedeutung dem strukturellen Feinbau zukommen kann.

1. *Bisherige Möglichkeiten der Charakterisierung von Polysacchariden.*

Was kann man bis jetzt von einem tierischen Polysaccharid im allgemeinen bestimmen? Die Drehung, die Elementarzusammensetzung, die einzelnen Bausteine, die Fähigkeit der Reduktion und einige Farbenreaktionen. Alle diese angeführten Reaktionen genügen aber keineswegs, um eine hochmolekulare Substanz von der Art der Polysaccharide zu charakterisieren und vor allem Unterschiede des Feinbaus zu erkennen. Die Kenntnis, daß die und die Einzelbausteine ein Molekül aufbauen, nützt uns nur wenig. Es gibt tausende Verknüpfungsmöglichkeiten. Selbst einzelne der erhaltenen Bausteine können sich während der Hydrolyse erst aus anderen gebildet haben.

Wir wiesen nun wiederholt darauf hin, daß die einen Forscher einer isolierten Substanz eine spezifische Wirkung zusprechen, andere diese wieder abstreiten. Hier liegt die Möglichkeit vor, daß

bei der Isolation der Stoffe Umlagerungen und Veränderungen vor sich gingen, die mit den oben genannten Methoden nicht zu erkennen sind.

Wir hatten uns deshalb beim Beginn unserer Untersuchungen über tierische Polysaccharide die Aufgabe gestellt, eine Methode zu finden, die ein weiteres Mittel zur genaueren Charakterisierung der Polysaccharide darstellt.

2. *Fraktionierte Hydrolyse als Mittel zur Konstitutionsaufklärung.*

Freudenberg (52) und seine Mitarbeiter benutzten wohl mit als erste die kontinuierliche Beobachtung der Hydrolyse von Stärke zur Konstitutionsaufklärung. Es wurde dabei die in der Kälte erfolgende Hydrolyse durch konzentrierte Schwefelsäure durch den Zuwachs des Reduktionsvermögens und der Veränderung der optischen Drehung beobachtet.

Die Zunahme der Reduktion und die Veränderung der Drehung erfolgt nun nicht gleichmäßig in gleichen Zeitabständen, sondern in einer Kurve, die bei gleichbleibenden äußeren Bedingungen lediglich durch die Art der Stoffe und die Art der Verknüpfung ihrer Bausteine bestimmt ist. Prinzipiell könnte man aus den Kurven aller Stoffe die Konstitution ermitteln. Aber schon im Falle der Stärke, als eines Polysaccharides mit nur einem Baustein, ist die Berechnung ganz außerordentlich schwierig und kompliziert, so daß bei einem Polysaccharid, das aus verschiedenen Bausteinen aufgebaut ist, die Lösungsaussichten nur sehr gering sind.

Wir hatten uns nun aber nicht das Ziel gesteckt, eine Konstitutionsaufklärung zu schaffen, sondern eine Methode zu finden, die eine genauere Charakterisierung der Polysaccharide gestattet. Die Kurven, die man erhält, wenn man auf irgendeine Weise den Fortgang der Hydrolyse eines Polysaccharides unter gleichbleibenden Bedingungen verfolgt, ist aber im höchsten Maße für dieses Polysaccharid charakteristisch.

Unser Ziel war es nun, gegenüber den von Freudenberg und Mitarbeitern angewandten Methoden, die sehr lange Zeit benötigen, eine schnellere und dabei möglichst automatische Methode zu finden.

Als Vorversuche wollten wir prüfen, ob Polysaccharide, die aus mehreren Bausteinen zusammengesetzt sind, mit den bis jetzt zur Verfügung stehenden Untersuchungsmitteln charakteristische reproduzierbare Kurven ergeben, die sich von anderen Polysacchariden, die ganz ähnlich gebaut sind, doch deutlich unterscheiden lassen.

Daß die Aufspaltung eines Polysaccharides aus verschiedenen Bausteinen nicht gleichmäßig erfolgt, ist leicht theoretisch einzusehen. Die Abspaltung von labilen Bindungen eines komplexen Polysaccharides wird sehr rasch erfolgen, während andere festere Bindungen längere Zeit zu einer Loslösung benötigen. Wenn also Polysaccharide, die aus einem Baustein bestehen, noch verhältnismäßig einheitliche Kurven ergeben, müssen von komplexen Polysacchariden Überlagerungskurven erhalten werden, die sich aus den Einzelkurven zusammensetzen.

Als Versuchssubstanz für die Vorversuche benutzten wir als Beispiel eines komplexen Polysaccharides verschiedene Pektinarten. Als Vertreter der Polysaccharide, die nur aus einem Baustein aufgebaut sind, nahmen wir Glykogen und Stärke.

Die Pektine haben wir aus mehreren Gründen gewählt:

1. Es wird, wie schon im ersten Teil geschildert, behauptet, daß fast jedes einzelne Pektinpräparat sich voneinander unterscheidet, sei es, daß daran die verschiedenen Darstellungsmethoden schuld sind, sei es, daß der Reifegrad der Früchte, aus denen es dargestellt wurde, wechselte oder sei es endlich, daß das Pektin überhaupt aus verschiedenen Pflanzen stammt. Trotz allem aber unterscheiden sich die Einzelbausteine der Pektinarten nur sehr wenig.

Wir haben also hier den für unsere Zwecke idealen Fall, daß es einen Stoff gibt, dessen einzelne Präparate sich, bei sehr großer Ähnlichkeit ihrer Bausteine, doch deutlich voreinander unterscheiden.

Wenn wir nun von verschiedenen Pektinpräparaten für jedes einzelne charakteristisch reproduzierbare Kurven erhalten, so kann man das als eine Probe für die Genauigkeit der Methode bewerten. Es ist dann auch zu hoffen, daß man bei den in Frage kommenden tierischen Polysacchariden Kurven erhält, die für den Feinbau charakteristisch sind.

3. *Prinzip und Ausführung der zu den Vorversuchen verwendeten Methode.*

Prinzip: Hydrolyse der stark verdünnten Substanzlösung durch verdünnte Säure bei 100° C unter fortlaufender Bestimmung des Reduktionsvermögens nach Hagedorn-Jensen.

Ausführung: Zur Hydrolyse wird 0,5 normale oder 1 normale Schwefelsäure genommen. Die Verdünnungsverhältnisse werden so gewählt, daß auf 5 ccm 0,5 n oder 1 n Schwefelsäure 1 ccm einer 0,03 oder 0,06 %igen Lösung der zu hydrolisierenden Sub-

stanz kommen. Die Hydrolyse wird in einem Kolben mit aufgesetztem, durchbohrten Rückflußkühler durchgeführt, der in einem Wasserbad hängt, das genau auf einer Temperatur von 100° C gehalten wird. Alle 5 Minuten werden aus dem Kolben gleich große Portionen genommen, in ein Reagenzglas gegeben, das 3 Minuten in Eiswasser von 0° C gestellt wird. Darnach wird das gekühlte Hydrolysat durchgeschüttelt und in 3 Blutzuckerröhrchen, die zuvor mit je 5 ccm 0,5 n oder 1 n Natronlauge gefüllt wurden, je 6 ccm Hydrolysat gegeben. Es ist dabei streng darauf zu achten, daß kein Säureüberschuß besteht. Den Einfluß eines nur ganz geringen Säureüberschusses auf die Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen zeigt die Tabelle No. 1.

Versuch über den Einfluß des pH auf die Hagedorn-Jensen-Bestimmung

Es wurden verwandt je 1 ccm 10 mg%ige Glukoselösung.
5 ccm n/1 H_2SO_4
5 ccm n/1 HaOH.

Dazu wurde ein jeweils verschieden großer Säureüberschuß gegeben.

Säureüberschuß	Titrationswert	mg%	Glukose
O	+ 1,27 + — +	100	
2 ccm n/100 H_2SO_4	+ 1,27 + 1,26 +	100	101
4 „ „	+ 1,27 + 1,26 +	100	101
6 „ „	+ 1,27 + 1,30 +	100	94
2 Tropfen n/1 H_2SO_4	+ 1,41 + 1,40 +	74	76
gleich etwa 10 ccm n/100 „			
3 Tropfen N/1 „	+ 1,55 + 1,56 +	59	57
4 Tropfen „ „	+ 1,73 + 1,75 +	17	13
Basenüberschuß			
O	+ 1,27 + — +	100	—
1 Tropfen n/1 NaOH = etwa 5 ccm n/100 „	+ 1,27 + 1,28 +	100	98
2 Tropfen n/1 NaOH	+ 1,29 + 1,27 +	96	100
3 „ n/1 „	+ 1,27 + 1,28 +	100	98
4 „ n/1 „	+ 1,27 + 1,29 +	100	96

Leerwert: 1,82—1,83.

Es geht aus dieser Tabelle hervor, daß schon zwei ganz kleine Tropfen der Pipette von je etwa 0,03 ccm Größe einen Abfall des wahren Reduktionswertes um etwa 25 % bedingen. Es ist also genauestes Arbeiten erforderlich. Da ein geringer Laugenüberschuß keinerlei Änderungen des Reduktionswertes mit sich bringt, empfiehlt es sich, zur Sicherheit immer noch einen Tropfen Lauge hinzuzufügen.

Zur Reduktionsbestimmung wird die Methode Hagedorn-Jensen mit einer kleinen Abänderung benutzt. Es werden nämlich zur Reduktionsbestimmung Mengen verwendet, die bis zu 700 mg % Zucker entsprechen. Dadurch gelingt es, die bei 100 mg % theoretisch bis ± 7 mg % betragende Schwankungsbreite auf ein wesentlich geringeres Maß zurückzuschrauben. Zahlreiche Versuche mit genau eingestellten Traubenzuckerlösungen erwiesen, daß die Schwankungsbreite nicht höher als ± 3 mg % ist. Bei der Reduktionsbestimmung werden wegen der größeren Substanzmenge 4 ccm Thiosulfat vorgelegt.

Die Gesamtdauer der Hydrolyse beträgt 5—8 Std., d. h. also, daß bei jedem Versuch 70—100 Reduktionsbestimmungen vorgenommen worden sind. Dieser mühevolle Weg der Vorversuche war aber notwendig, um erst einmal einen Einblick in die Kurvenverhältnisse zu bekommen, um dann entscheiden zu können, ob sich eine automatisierte Methode lohnt.

4. *Ergebnisse der Vorversuche.*

a) Glykogen- und Stärkekurven.

Als erstes Beispiel sollen zwei Kurven von Glykogen und Stärke folgen, die beide nach der oben genannten Methode durch Hydrolyse mit 1 normaler Schwefelsäure gewonnen wurden. Es wurde eine Menge jeder Substanz eingegeben, die bei der Bestimmung 500 mg % entsprach. Die Anfangsreduktion lag bei dem löslichen Stärkepräparat bei 10 mg % und bei dem Glykogenpräparat bei 20 mg %. Wie aus der Kurve ersichtlich ist, erfolgt die Hydrolyse bei beiden Stoffen nach einer regelmäßigen Kurve. Die Kurve des Stärkepräparates steigt dabei aber schneller an als die des Glykogens. Die Stärke ist schon nach 220 Minuten vollständig aufgespalten, während die Hydrolyse des Glykogens erst nach 710 Minuten beendet ist. Es muß hier aber darauf hingewiesen werden, daß die erhaltenen Kurven nur als Beispiele dienen sollen. Um die „richtigen" Glykogen- und Stärkekurven zu erhalten, muß man auch

die Darstellung der Präparate genau kennen und nach einheitlichen Gesichtspunkten vorgehen.

Wie aus den Kurven weiterhin zu ersehen ist, steigt die Stärke nur bis 440 mg % und die Glykogenkurve bis 455 mg % gegenüber dem eingewogenen %-Satz von 500 mg %. Zwei Ursachen sind für diese Differenz anzunehmen: 1. eine Zerstörung der anfangs abgespaltenen Glukose bei der Kochdauer von mehreren Stunden und 2. der Wassergehalt der Präparate.

Die abgebildeten Kurven wurden von den gleichen Präparaten mehrfach in einem Abstand von über 2 Monaten gewonnen. Die Abweichungen betrugen nie mehr als 0,75 %. Man kann also sagen, daß die Methode bei einfachen Polysacchariden schon recht genau arbeitet.

Die nächsten beiden Kurven (No. 2a und 2b) zeigen ebenfalls Glykogen und Stärke, aber bei einer Hydrolyse mit 0,5 n Schwefelsäure. Der Verlauf dieser beiden Kurven überrascht etwas. Bei der Hydrolyse mit 1 n Schwefelsäure liegt die Stärkekurve immer höher als die des Glykogens. Hier aber, bei der Hydrolyse mit 0,5 n Schwefelsäure, ist der Reduktionszuwachs des gleichen Stärkepräparates anfangs niedriger als der des Glykogens, um erst nach 240 Minuten die Glykogenkurve zu schneiden. Als Erklärung kann man sich vorstellen, daß das Glykogenmolekül durch 0,5 n Schwefelsäure leichter in größere Bruchstücke aufgespalten wird als die Stärke, daß aber die Stärkebruchstücke die endgültige Hydrolyse zu Glukose leichter erfahren als die Bruchstücke des Glykogenmoleküls.

Man sieht aus diesem Beispiel, daß es sehr nützlich ist, die zu untersuchenden Stoffe bei verschiedenen Säurekonzentrationen zu hydrolisieren.

b) Apfelpektinkurven.

Wir wenden uns nun der Betrachtung der komplexen Polysaccharide zu. Am Anfang sollen zwei Kurven (No. 3) eines Apfelpektinpräparates stehen. Da die Reduktionskraft dieser Präparate nach der gleichen Zeit der Hydrolyse geringer ist als bei Glykogen und Stärke, nahmen wir zunächst Mengen, die bei der Bestimmung 1000 mg % entsprechen. Bei den abgebildeten Kurven des Pektinpräparates sind die Reduktionsbestimmungen nur alle 20 Minuten vorgenommen worden.

Die Kurven steigen in den ersten 20 Minuten sehr steil an — über die Hälfte des Gesamtanstieges —, um dann nach einem ziem-

lich scharfen Knick wesentlich langsamer emporzuklettern. Man erkennt an dem Kurvenverlauf schon deutlich, daß es sich hier um ein komplexes Polysaccharid handelt.

Der anfänglich steile Anstieg der Kurve entspricht höchstwahrscheinlich der Abspaltung der Arabinose, während der spätere Reduktionszuwachs der Abspaltung der Galaktose und Galakturonsäuren zuzuschreiben sein wird. Wir möchten noch die Aufmerksamkeit darauf lenken, daß nach 200 Minuten die Kurve etwas verhält, um dann wieder stärker anzusteigen. Wir werden weiter unten darauf zurückkommen.

Bei den beiden nächsten Kurven (No. 4) fällt der wechselnde ungleichmäßige Verlauf auf. Diese Kurven sind aber vom selben Pektinpräparat unter gleichen Bedingungen gewonnen worden. Der einzige Unterschied ist der, daß hier die Reduktionsbestimmungen alle 4—5 Minuten vorgenommen wurden. Es liegt natürlich der Gedanke nahe, daß es sich um Fehlbestimmungen handelt, zumal die Schwankungen, die den unregelmäßigen Kurvenverlauf verursachen, nie größer als 10 mg % sind. Alle anderen Tatsachen sprechen aber gegen die Annahme eines Bestimmungsfehlers.

1. Verbindet man die Kurvenpunkte, die alle 20 Minuten gewonnen wurden, so erhält man eine Kurve, die der vorigen (No. 3) fast gänzlich gleicht.

2. Die Kurven wurden mehrmals in der gleichen Form erhalten in Abständen von Wochen!

3. Jeder Kurvenpunkt wurde durch drei Doppelbestimmungen erhalten. Es ist doch sehr unwahrscheinlich, daß die gleichen Fehler in drei Bestimmungen vorkommen sollten und dazu noch bei mehreren Versuchen. Gegen die Annahme eines Bestimmungsfehlers spricht endlich

4. die Tatsache, daß bei den Polysacchariden, die nur aus 1 Baustein zusammengesetzt sind, derartige Erscheinungen nie beobachtet wurden.

Wir sind deshalb zu der Überzeugung gekommen, daß es zumindest außerordentlich wahrscheinlich ist, daß der Verlauf der Hydrolyse dieses Pektinpräparates durch die Kurven No. 4 richtiger dargestellt wird, als durch die Kurven No. 3.

Das Ergebnis ist auf alle Fälle überraschend! Wenn dieser Kurvenverlauf stimmt, so sind die Kurven wirklich im höchsten Maße charakteristisch. Es genügt dann aber zweifellos nicht, auch nur alle 4 Minuten einen Einblick in die Kurvenverhältnisse zu bekommen, sondern man muß die Möglichkeit haben, den Fortgang der

Hydrolyse kontinuierlich verfolgen zu können. Es ist dies natürlich nicht einfach. Im zweiten Abschnitt des letzten Teiles werden wir über eine solche Methode zur kontinuierlichen Verfolgung der Hydrolyse berichten.

Die nächsten beiden Kurven (No. 5 a und 5 b) zeigen ein anderes Apfelpektinpräparat. Die Anfangsreduktion liegt hier bedeutend niedriger. Die ersten beiden Kurven sollen den Unterschied, der durch die Änderung der Säurekonzentration von 0,5 n zu 1 n Schwefelsäure bedingt ist, zeigen. Die Reduktionsbestimmungen wurden hier alle 25—30 Minuten vorgenommen. Daraus erklärt sich der scheinbar regelmäßige Kurvenverlauf. Wie man sieht, ist bei beiden Säurekonzentrationen der erste Steilanstieg gleich. Das bedeutet also, daß dieses Hydrolysentempo nicht mehr gesteigert werden kann. Die Arabinose spaltet sich demnach bei 0,5 n Schwefelsäure genau so schnell ab wie bei 1 n Schwefelsäure. Die Änderung des Kurvenverlaufes kommt lediglich im II. Abschnitt zur Geltung. In diesem zweiten Abschnitt dürfte die Abspaltung der Galaktose noch im Gange sein. Wenn auch diese restlos abgespalten ist, so verläuft die Kurve bei 0,5 n Säure fast waagrecht. Das mag daher rühren, daß die schwer hydrolysierbaren Polygalakturonsäuren nur sehr langsam aufgespalten werden und der dadurch bedingte Reduktionszuwachs der Abnahme durch Zerstörung von Arabinose gleichkommt.

Bei 1 n Schwefelsäure steigt die Kurve weiter an, da die Abnahme der Arabinose bei dieser Konzentration nicht viel größer wird, aber sich die stärkere Aufspaltung der Polygalakturonsäuren schon bemerkbar macht.

Die nächste Kurve (No. 6) zeigt das gleiche Pektinpräparat mit 0,5 n Schwefelsäure hydrolysiert. Jetzt sind aber wieder alle 3 bis 4 Minuten die Reduktionsbestimmungen vorgenommen worden. Wie bei der Kurve No. 4 ergibt sich hier ein ganz ähnliches Bild. Es zeigt sich ebenfalls wieder ein unregelmäßger Kurvenverlauf, während die Bestimmungspunkte alle 20 Minuten mit der vorherigen Kurve übereinstimmen.

c) Citropektin- und Arabankurven.

Es folgt nun die Kurve eines Citro-Pektinpräparates (No. 7). Dieses Präparat stammt aus einer anderen Quelle als die Apfelpektinpräparate. Der Pektinsäuregehalt wurde mit etwa 30% angegeben. Die erhaltene Kurve überrascht. Nach einem ersten steilen Stück und einem Knick der Kurve nach 40 Minuten steigt sie fast

5½ Stunden völlig linear an. Ein solcher Anstieg ist nur erklärlich durch die Anwesenheit eines sehr schwer hydrolysierbaren, aber stark reduzierenden Zuckers in verhältnismäßig großer Menge. Da wir aber die Darstellung und das Ausgangsmaterial des Präparates nicht kennen, ist eine weitere Erörterung darüber nicht möglich. Dieser Fall zeigt trotzdem wieder deutlich, wie verschieden und charakteristisch jede Kurve ist.

Die Kurven No. 8 a und 8 b zeigen ein Arabanpräparat mit 0.5 n und 1 n Schwefelsäure hydrolysiert. Das Präparat besteht aber sicher nicht nur aus reinem Araban. Die Anfangsreduktion ist sehr niedrig. 8 mg %. Bei der Hydrolyse mit 0,5 n Schwefelsäure steigt die Kurve bis 220 mg % an, um dann nach 180 Minuten Hydrolysedauer wieder zu fallen. Bei der Hydrolyse mit 1 n Schwefelsäure steigt die Kurve im Anfang nur wenig steiler, aber sie steigt auch nach 180 Minuten noch an. Das deutet darauf hin, daß eine größere Menge leicht abspaltbare und eine geringere Menge schwerer hydrolysierbare Substanz vorhanden ist.

d) Mischkurven.

Die nächsten Kurven Nr. 9 sind Mischkurven. Es wurden zusammen Pektin und Glykogen hydrolysiert. Die Kurve No. 9 a gibt den Verlauf der Hydrolyse eines Gemisches von 1000 mg Pektin und 200 mg % Glykogen mit 0,5 n Schwefelsäure wieder. Wie man sieht, haben sich die Pektin- und Glykogenkurven wirklich überlagert. Jede Substanz hydrolysiert ganz charakteristisch und die erhaltene Kurve läßt beide Faktoren erkennen. Bei dieser Kurve, die durch Reduktionsbestimmungen alle 5—6 Minuten gewonnen wurde, treten wieder die Knicke der Pektinkurve auf, so daß hier ein weiteres Argument vorliegt zu glauben, diese Kurven zeigten den tatsächlichen Ablauf der Hydrolyse. Die Kurve No. 9 b zeigt den Verlauf der Hydrolyse eines Gemisches von je 500 mg Pektin und Glykogen mit 1 n Schwefelsäure. Auch hier treten, wenn auch nur sehr schwach angedeutet, wieder zwei Knicke in der Kurve auf, wenn auch der Kurvenverlauf jetzt mehr Ähnlichkeit mit der des Glykogens aufweisen muß.

Konstruiert man sich nun eine Kurve, indem man die Werte für je 500 mg Pektin und Glykogen addiert, so zeigt sich, daß diese theoretische Kurve anfangs über der erhaltenen liegt. Das hat folgenden Grund: Hydrolysiert man unter den hier angegebenen Bedingungen eine Menge Glykogen, die 500 mg %, und dann eine, die 1000 mg % entspricht, so ist der Reduktionszuwachs nach beispielsweise 40 Minuten bei der 1000 mg %-Lösung nicht doppelt so

groß, sondern geringer als dem zweifachen Wert der 500 mg %-Kurve entspricht. Diese Verhältnisse zeigen die beiden letzten Kurven No. 9 c und 9 d.

5. Kritik der Vorversuche.

Als Ergebnis unserer Vorversuche kann man also sagen, daß die benutzte Methode schon sehr brauchbare Resultate liefert. Verschiedene Nachteile hat die Methode aber noch.

1. Sie ist außerordentlich zeitraubend und umständlich und erfordert auch bei den bis zu mehreren Hundert betragenden Reihenbestimmungen höchste Genauigkeit. Trotzdem wird jedoch nur höchstens alle 4 Minuten ein Bild des Standes der Hydrolyse gewonnen. Während diese Zeitabstände bei einfachen Kurven wie den Stärkekurven durchaus genügt, ja hier wären auch Abstände von 15 Minuten noch nicht zu groß, so zeigt es sich, daß diese Unterbrechungen zu lang sind, wenn es sich um Überlagerungskurven komplexer PS. handelt. Bei diesen Überlagerungskurven z. B. der Pektine, bei denen ein beginnender Kurvenverlauf abgebrochen wird, Knicke und manchmal sogar rückläufige Bewegungen eintreten, tauchen dann doch manchmal Zweifel auf, wie der genaue Kurvenverlauf eigentlich ist.

II. Die kontinuierliche Beobachtung der Hydrolyse von Polysacchariden mittels einer elektro-potentiometrischen Methode

Auf Grund der Ergebnises der Vorversuche bemühten wir uns, eine Methode zu finden, die eine wirklich kontinuierliche Verfolgung der Hydrolyse gestattet und dabei doch leichter durchzuführen ist.

Wir untersuchten deshalb die Möglichkeiten, die die elektropotentiometrischen Methoden bieten. Man könnte auf den Gedanken kommen, einfach das Redoxpotential einer PS-Lösung während der Hydrolyse zu verfolgen und seine Änderung laufend zu bestimmen. Dieser einfache Weg kommt aber leider nicht in Betracht. Wie z. B. Michaelis in seinem Buch „Oxydations-Reduktionspotentiale" berichtet, bilden zwar Zucker an indifferenten Elektroden Potentiale, die aber sehr lange Zeit zur Einstellung brauchen

und dabei noch schlecht reproduzierbar sind. Um aber die Änderung des Potentials während der Hydrolyse laufend verfolgen zu können, brauchen wir ein System, das sofort oder mit nur ganz geringer Verzögerung reagiert.

1. Prinzip der elektropotentiometrischen Titration.

Wir benutzten als Ausgangspunkt eine Methode, wie sie bei der anorganischen potentiometrischen Maßanalyse gebräuchlich ist. Dort wird so vorgegangen, daß ein anorganischer Stoff, der an einer Elektrode ein Potential bildet, durch einen anderen Stoff entweder ausgefällt oder gänzlich oxydiert oder reduziert wird. Nun ändert sich das Potential so lange, bis der zu bestimmende Stoff entweder ganz ausgefällt oder ganz oxydiert oder reduziert ist. Dabei ist der Potentialsprung gegen Ende der Reaktion meist am größten und zeigt den Endpunkt der Titration an.

2. Notwendige Voraussetzungen einer potentiometrischen Methode für die kontinuierliche Verfolgung der Hydrolyse.

Wir wollten nun einen Stoff benutzen, der durch die abgespaltenen KH. reduziert wird. Die Geschwindigkeit der Potentialänderung wäre dann bei den sofort ansprechenden anorganischen Stoffen ein Maß für die Geschwindigkeit und Art der Hydrolyse der betreffenden Polysaccharide.

Es sind dabei aber noch einige Schwierigkeiten zu überwinden: Es muß nicht nur die Abnahme der oxydierten Stufe eine sofortige Potentialänderung zur Folge haben, sondern der sich abspaltende Zucker muß s o f o r t reduzieren bzw. selbst oxydiert werden. Unter normalen Verhältnissen ist dies nur selten der Fall. Hier liegen die Verhältnisse aber bei weitem günstiger. Wenn auch der anorganische Stoff, der reduziert werden soll, in etwa der gleichen Menge wie das PS. vorliegt, und in dem Falle, in dem der Zucker z. B. Glukose wäre, längere Zeit zur Gesamtreduktion brauchen würde, so muß man doch berücksichtigen, daß in unserem Fall in der Zeiteinheit immer nur ein geringer Bruchteil abgespalten wird, der sich jeweils einem großen Überschuß der anorganischen Substanz gegenüber sieht und natürlich viel schneller mit ihm zu Reaktion kommen kann. Man muß fernerhin berücksichtigen, daß ja das abgespaltene Bruchstück sicher in einer sehr reaktionsfähigen Form vorliegt.

3. *Das Bichromat im potentiometrischen System.*

Nach zahlreichen Vorversuchen über einen geeigneten anorganischen Stoff kamen wir zum Kaliumbichromat. Dies ist aber ein starkes Oxydationsmittel, das auch nicht reduzierende Stoffe von sich aus oxydiert. Es bestand also die Möglichkeit, daß das Bichromat das Polysaccharid seinerseits aktiv angreift und das Bild der Hydrolyse verwischt. Wenn man ein PS ohne Säure in wäßriger Lösung zusammen mit Bichromat erhitzt, so wird zweifellos auch das Bichromat das Polysaccharid angreifen und oxydieren. Wenn man aber noch Säure zur Lösung hinzufügt, dann ist diese Gefahr bei richtig gewählter Verdünnung nur sehr gering. Das Bichromat reagiert natürlich mit dem reduktionsfähigen, selbst also stark oxydationsbereiten frisch abgespaltenen KH. viel eher als mit dem noch nicht aufgespaltenen großen PS.-Molekül. Unsere Versuche erwiesen dies einwandfrei. Bei gleicher Bichromat- und Polysaccharid-Konzentration ist die Geschwindigkeit des Potentialabfalles nur durch die Säurekonzentration bestimmt. Wenn das Bichromat seinerseits auf das ungespaltene Molekül einwirkte, müßte eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Potentialabfalles bei gleicher Säurekonzentration von dem Gehalt an Bichromat zu bemerken sein. Bei den von uns verwendeten Konzentrationen ist das aber nicht der Fall.

Trotzdem sei hier eingefügt, daß es höchstwahrscheinlich Stoffe gibt, die für diese Zwecke b e s s e r als das Bichromat sind. Hier kommen vor allem die organischen Farbstoffe, die bei den Redoxuntersuchungen eine große Rolle spielen, in Betracht. Wir fanden zwar noch keinen Farbstoff, der geeignet war, doch ist anzunehmen, daß bei einer systematischen Durcharbeitung dieser Farbstoffe ein geeigneter Körper gefunden wird. Aber auch mit dem Bichromat konnte schon die Brauchbarkeit der Methode an sich erwiesen werden und darauf kam es uns jetzt vor allem an.

4. *Prinzip und Ausführung der elektropotentiometrischen Methode zur kontinuierlichen Beobachtung der Hydrolysen von Polysacchariden.*

Das Prinzip der Methoden ist demnach folgendes: Eine Lösung eines Polysaccharides wird mit verdünnter Schwefelsäure in Gegenwart von Kaliumbichromat erhitzt. Die durch die Säure frisch abgespaltenen Monosaccharide treten mit dem Bichromat sofort in Reaktion, wobei die Kohlehydrate oxydiert und das Bichromat

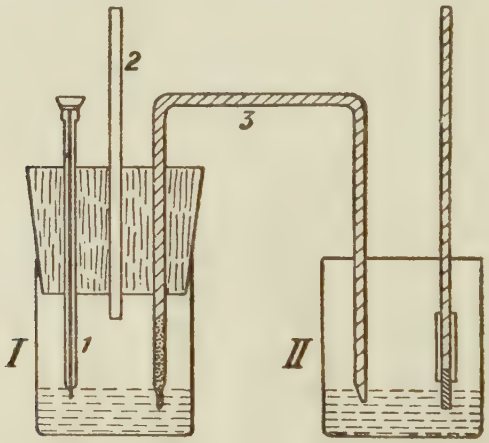
selbst in eine tiefere Oxydationsstufe übergeführt wird. Die Abnahme des Bichromates wird laufend durch die Änderung des elektrischen Potentiales mittels des Lautenschläger'schen Ultra-Ionograph bestimmt.

Ausführung:

a) Schaltanordnung.

Zunächst sei die bei allen elektropotentiometrischen Methoden wichtige Elektrodenanordnung beschrieben. Für die Messung in der Untersuchungsflüssigkeit wurde eine Platinelektrode benutzt, als Bezugselektrode nahmen wir eine Kalomelelektrode.

Die Schaltanordnung ist aus der folgenden Skizze ersichtlich:



Im Gefäß I befindet sich die Untersuchungsflüssigkeit, also die Bichromat-Säure und die Polysaccharidlösung. In diese taucht die Platin-Elektrode I ein, die direkt mit dem Meßinstrument verbunden ist. 2 ist ein Steigrohr, das als Rückflußkühler wirkt. 3 ist eine Kaliumchlorid-Agar-Agar-Brücke, die am Ende kapillär ausgezogen ist. Im unteren Drittel ist sie statt mit KCl-Agar mit KCl-Asbest gefüllt, damit kein Agar-Agar in die Lösung gelangen kann. Im Gefäß II befindet sich gesättigte KCl-Lösung. In diese Lösung taucht das andere Ende der KCl-Agar-Agar-Brücke und die Kalomel-Elektrode ein. Die Kalomelelektrode ist zum Schutz

gegen die Hitze erhöht aufgehängt. Ein etwa 200 mm langes, mit gesättigter KCl-Lösung gefülltes Glasrohr bringt die leitende Verbindung.

b) Praktische Durchführung der Bestimmungen.

Die beiden Glasgefäße I und II werden in ein Wasserbad von 70° C gebracht. Glasgefäß I ist zunächst noch leer. Im Gefäß II befindet sich die gesättigte KCl-Lösung. In Gefäß I werden dann je 10 ccm 1 %ige Bichromat- und 10- oder 20 %ige Schwefelsäure-Lösung gegeben. Beide Lösungen sind schon vorher im Wasserbad auf 70° zu erwärmen. Nach dem Einfüllen der beiden Lösungen wird der Stopfen des Gefäßes I mit der Elektrode eingesetzt und das Meßgerät, das schon vorher auf „Eichen" genau eingestellt wird, angeschaltet. Nach 10 Minuten zeigt dann das Meßgerät das endgültige Potential der Bichromat- und Schwefelsäurelösung an. Nun werden 10 ccm 2 %ige Lösung des zu untersuchenden Polysaccharides zugegeben, schnell durchgeschüttelt und der Abfall des Potentials laufend beobachtet.

5. Versuchsergebnisse:

Wir wollen auch hier wieder zuerst die Kurve eines einfachen Polysaccharides, und zwar der Stärke, betrachten. Die Kurve No. 10 zeigt die Hydrolyse mit 10%iger Schwefelsäure (die wirkliche Konzentration der Säure im Reaktionsgefäß ist durch die Verdünnung der je 10 ccm Bichromat- und Stärkelösung demnach 3,3%, bei Zugabe von 10 ccm 20%iger Schwefelsäure ist sie 6,6%). Die beiden Kurven erweisen eindeutig, was wir schon vorher sagten, nämlich, daß die Geschwindigkeit des Potentialabfalles nur von der Säurekonzentration abhängig ist. Bei doppelter Säurekonzentration ist der Potentialabfall fast doppelt so groß. Die Kurven verlaufen durchaus gleichmäßig.

Es braucht hier wohl nicht darauf hingewiesen zu werden, daß die Kurven, die durch Reduktionsbestimmung gewonnen wurden, und diese Potentialkurven nicht miteinander vergleichbar sind. Der Steilabfall gegen Schluß der Kurve entspricht nicht etwa einem plötzlich starken Auftreten von reduzierender Substanz, sondern es ist, wie schon betont, der Potentialabfall in dem Augenblick am stärksten, in dem fast alles Bichromat verschwunden ist.

Zur weiteren Erhärtung der Behauptung, daß tatsächlich nur die Konzentration der Säure und die Eigenschaften des Zuckers für den Verlauf der Kurven wesentlich sind, und nicht etwa der

aktiven Oxydationswirkung des Bichromats die Hauptrolle zukommt, folgen Kurven (No. 11—13) von Milchzucker und Maltose, die bei 3,3%iger Schwefelsäurekonzentration gewonnen wurden.

Es ist bekannt, daß Maltose sich etwas langsamer aufspaltet als Milchzucker. Man sieht in der Tat, daß der Milchzucker bereits nach 100 Minuten sämtliches Bichromat reduziert hat, während die Maltose dazu 130 Minuten gebraucht hat. Die einzelnen erhaltenen Kurven der Doppelbestimmungen decken sich praktisch völlig. Lediglich in der Nähe des Knickes sind Abweichungen von ± 2 Millivolt zu verzeichnen.

Die Genauigkeit der Methode ist also bei diesen einfachen Disacchariden und den nur aus einem Baustein zusammengesetzten Polysacchariden schon weit größer als wir erwarteten. Im Vergleich zu den Stärkekurven fällt auf, daß in der Mitte der Kurve ein stärkerer Knick steht. Um Bestimmungsfehler kann es sich nicht handeln. 1. Wurde alle 30 Sekunden der Zeigerstand des Millivoltmeters notiert und auch zwischendurch auf besondere Bewegungen geachtet. 2. Treten diese Knicke bei allen Kurven an völlig gleicher Stelle auf.

Es besteht trotzdem die Möglichkeit, daß dieser Knick, der in der Nähe des Umschlagspunktes der Kurve steht, durch eine Eigenschaft der Elektrode bedingt ist, die auf den plötzlich kleiner werdenden Abfall des Potentials, nachdem sie sich vorher auf einen größeren Abfall eingestellt hatte, erst etwas verspätet reagiert und anzeigt. Dieser Punkt würde durch eine solche Verzögerung überbetont.

Man scheidet bei elektropotentiometrischen Bestimmungen derartige Fehler, die durch das Verhalten einer Elektrode verursacht sein können, dadurch aus, daß man in das Reaktionsgefäß gleichzeitig drei Elektroden eintauchen läßt und sie in solchen Fällen immer wieder vergleicht. Selbst äußerlich völlig gleiche, aus demselben Material hergestellte Elektroden, sprechen manchmal auf gleiche Potentialabfälle verschieden an. Es standen uns leider keine weiteren Platinelektroden zur Verfügung, die zum Vergleich hätten dienen können. Deshalb ist es uns vorerst nicht möglich, diese Frage zu entscheiden. Sobald wir im Besitz einer solchen obenerwähnten dreifachen Elektrodenanordnung sind, werden wir diese Frage klären.

Unsere nächste Aufgabe war, zu untersuchen, welches die kürzeste Zeit ist, in der man noch sicher reproduzierbare Kurven erhält. Wir fanden die Grenze bei 80—90 Minuten liegen. Verwendet man so hohe Säurekonzentrationen oder so leicht hydrolysierbare

Substanzen, daß der gesamte Potentialabfall in weniger als 80 Minuten erfolgt, so spricht die Elektrode nicht mehr genügend schnell an und die Bestimmungen werden fehlerhaft.

Wir zeigen diese Verhältnisse an Kurven (No. 14—18) von Maltose und Milchzucker, die diesmal bei einer Schwefelsäurekonzentration von 6,6% hydrolysiert wurden. Wenn auch der Endpunkt sämtlicher Kurven zur gleichen Zeit erreicht wird, so schwanken doch die Mittelstücke, vor allem bei den Maltosekurven, recht beträchtlich. Man sieht aber selbst hier recht deutlich, daß das Bichromat beim Milchzucker schon nach 55 Minuten restlos reduziert ist, während dies bei der Maltose erst nach 70 Minuten der Fall ist.

Als nächste Substanz untersuchten wir das gleiche Apfelpektinpräparat No. 1 wie im 1. Teil der Arbeit (Kurven 19—20). Die Hydrolyse erfolgte mit 6,6%iger Säure. Auf den ersten Blick fällt hier, wie bei den früheren im übrigen nicht vergleichbaren Pektinkurven, die ungleichförmige Gestalt auf. Uns setzte vor allem ein völliges Sistieren des Potentialabfalles in der Mitte des letzten steilen Stückes der Kurve in Erstaunen. Um einen Bestimmungsfehler im üblichen Sinn kann es sich nicht handeln, denn diese Erscheinung wurde ja vom Millivoltmeter objektiv registriert. Es bleibt nur die Möglichkeit, daß die Elektrode nicht in Ordnung war. Dagegen spricht aber folgende Tatsache: Der letzte Absatz in der Kurve trat bei sämtlichen, auch mit anderen Säurekonzentrationen gewonnenen Pektinkurven — insgesamt 18 — auf, während bei sämtlichen 20 anderen Kurven einfacher Zucker oder Polysaccharide diese Erscheinungen niemals auch nur angedeutet zu beobachten waren. Es ist also in der Tat anzunehmen, daß diese Stufen keine Anzeigefehler der Elektrode sind, sondern wirklichen Vorgängen entsprechen.

Die Schwankungsbreite der Kurven ist hier im ganzen etwas größer (bis ± 9 Millivolt), aber der Gesamtcharakter der Kurven ist trotzdem immer der gleiche. Die nächste Kurve (No. 21) stellt den Mittelwert der vom Apfelpektinpräparat No. 2 gewonnenen Kurven dar. Auch hier ist, bei geringen Abweichungen, der Charakter der Kurven der gleiche.

Die Kurven No. 22—24 stammen wieder vom Pektinpräparat No. 1, das diesmal mit einer Säurekonzentration von 3,3% hydrolysiert wurde. Es zeigt sich auch hier wieder im letzten Steilabfall der Kurve das völlige Sistieren während einiger Minuten. Die Art der Kurven ähnelt denen, die mit stärkerer Säurekonzentration erhalten wurden, nur sind sie stärker auseinandergezogen.

Zum Schluß folgt die Kurve (No. 25) von Pektolaktonsäure, die mit 3,3%iger Säure hydrolysiert wurde. Das Präparat wurde uns vom Ehrlich'schen Institut freundlicherweise überlassen. Wie im theoretischen Teil behandelt, soll Pektolaktonsäure der aufgespaltene Viererring der Pektolsäure sein. Bei der Kurve fällt die außerordentlich langgestreckte Form auf. Man sieht also daraus, daß diese Säure besonders schwer hydrolysierbar ist.

6. Kritik der Ergebnisse:

Als Ergebnis der Versuche eine automatische Methode zur Charakterisierung von Polysacchariden zu finden, muß man feststellen, daß die benützte Methode im Prinzip sich bewährt hat. Bei einfachen Polysacchariden können die mit ihr erhaltenen Ergebnisse schon befriedigen. Zur weiteren Verbesserung ist es nötig, Stoffe zu finden, die indifferenter als das Kaliumbichromat sind und doch sofort ansprechen, wie manche organische Farbstoffe.

Zusammenfassung

1. Im ersten theoretischen Teil wird ein Überblick über den derzeitigen Stand der Kenntnisse über Polysaccharide gegeben.
   Zunächst werden die pflanzlichen Polysaccharide gebracht und hier gezeigt, welche chemischen Probleme der Polysaccharide noch zu lösen sind und auf die Schwierigkeiten hingewiesen, die einer vollkommenen chemischen Aufklärung bis jetzt entgegenstehen. Ausführlicher wird auf solche pflanzlichen Polysaccharide eingegangen, die entweder mit tierischen verwandt sind oder doch größere biologische Wirkungen besitzen, wie z. B. das Pektin. Den pflanzlichen Gummen wurde ein etwas größerer Raum gewidmet, da sie mit den Antigen-Polysacchariden der Bakterien große Ähnlichkeit besitzen sollen.

2. Die tierischen Polysaccharide werden im ganzen ausführlicher dargestellt und besonderer Wert wird auf ihre Funktionen im Tierkörper gelegt und dabei gezeigt, daß es sehr nötig ist, Methoden zu haben, die eine genaue Charakterisierung der einzelnen, oft mehr nahe verwandten Polysaccharide zulassen.

3. Im praktischen Teil wird über den Versuch, eine solche Methode zu finden, berichtet. Als ein gutes Mittel zur Charakterisierung werden die Kurven angesehen, die man erhält, wenn man den Verlauf der Hydrolyse von Polysacchariden mittels verdünnter Säuren auf irgendeine Weise beobachtet.
   Als Vorversuch wird im Prinzip die folgende Methode angewandt: Hydrolyse der stark verdünnten Polysaccharid-Lösung durch 1n Schwefelsäure bei 100° C unter fortlaufender — alle 5 Minuten erfolgender — Bestimmung des Reduktionsvermögens nach Hagedorn-Jensen. Auf diese Weise wurden schon recht brauchbare und charakteristische Kurven erhalten.
   Die Methode hat aber doch noch verschiedene Schwächen: Sie ist außerordentlich zeitraubend und umständlich und erfordert auch bei den bis zu mehreren Hundert betragenden Reihenbestimmungen höchste Genauigkeit. Trotzdem wird jedoch nur höchstens alle 4 Minuten ein Bild des Standes der Hydrolyse gewonnen.

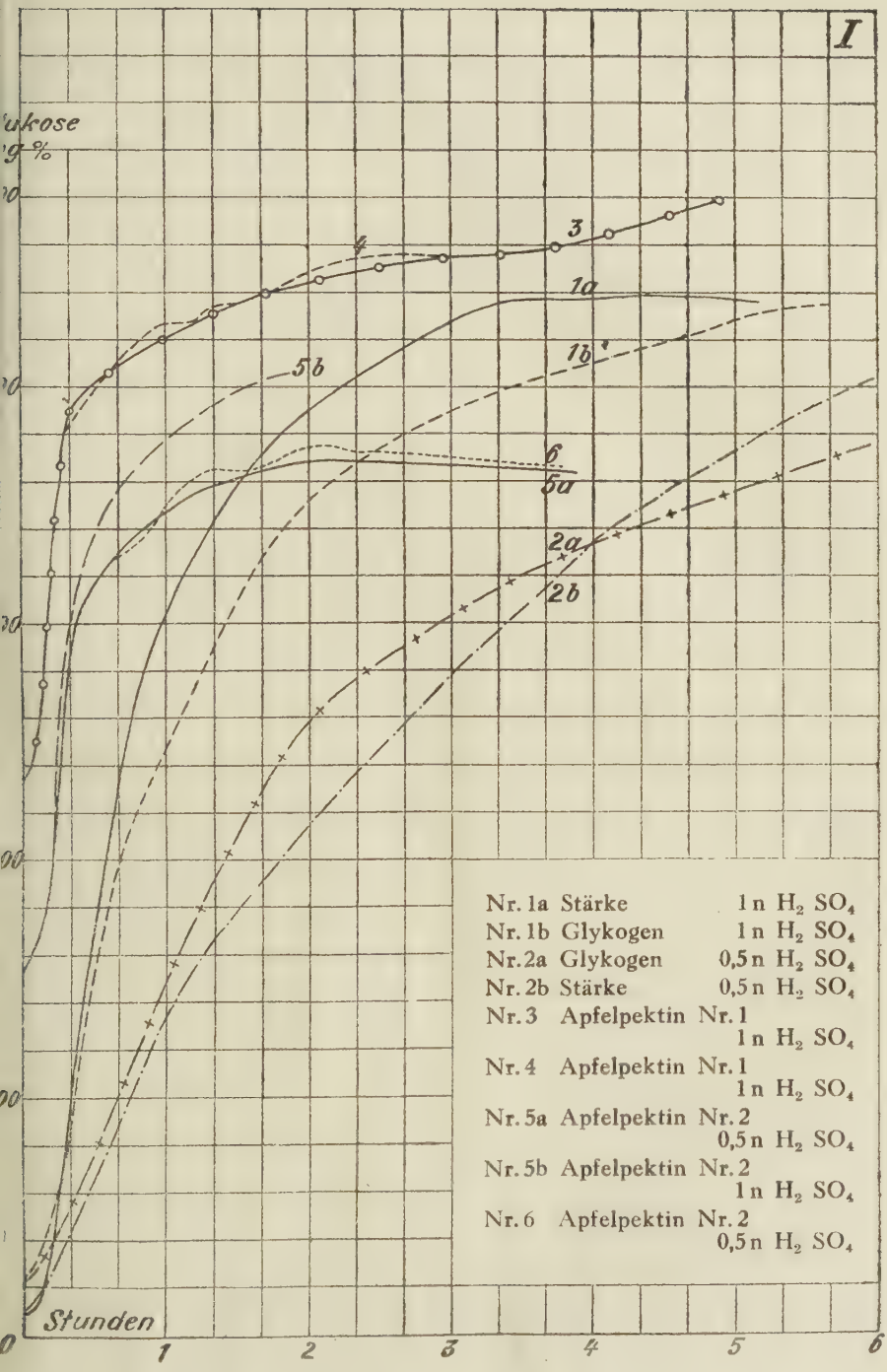
Während diese Zeitabstände bei einfachen Kurven wie den Stärkekurven durchaus genügen, ja hier wären auch Abstände von 15 Minuten noch nicht zu groß, so zeigt es sich, daß diese Unterbrechungen zu lang sind, wenn es sich um Überlagerungskurven komplexer Polysaccharide handelt. Bei diesen Überlagerungskurven, z. B. der Pektine, bei denen ein beginnender Kurvenverlauf abgebrochen wird, Knicke und manchmal sogar rückläufige Bewegungen eintreten, tauchen dann doch manchmal Zweifel auf, wie der genaue Kurvenverlauf eigentlich ist.

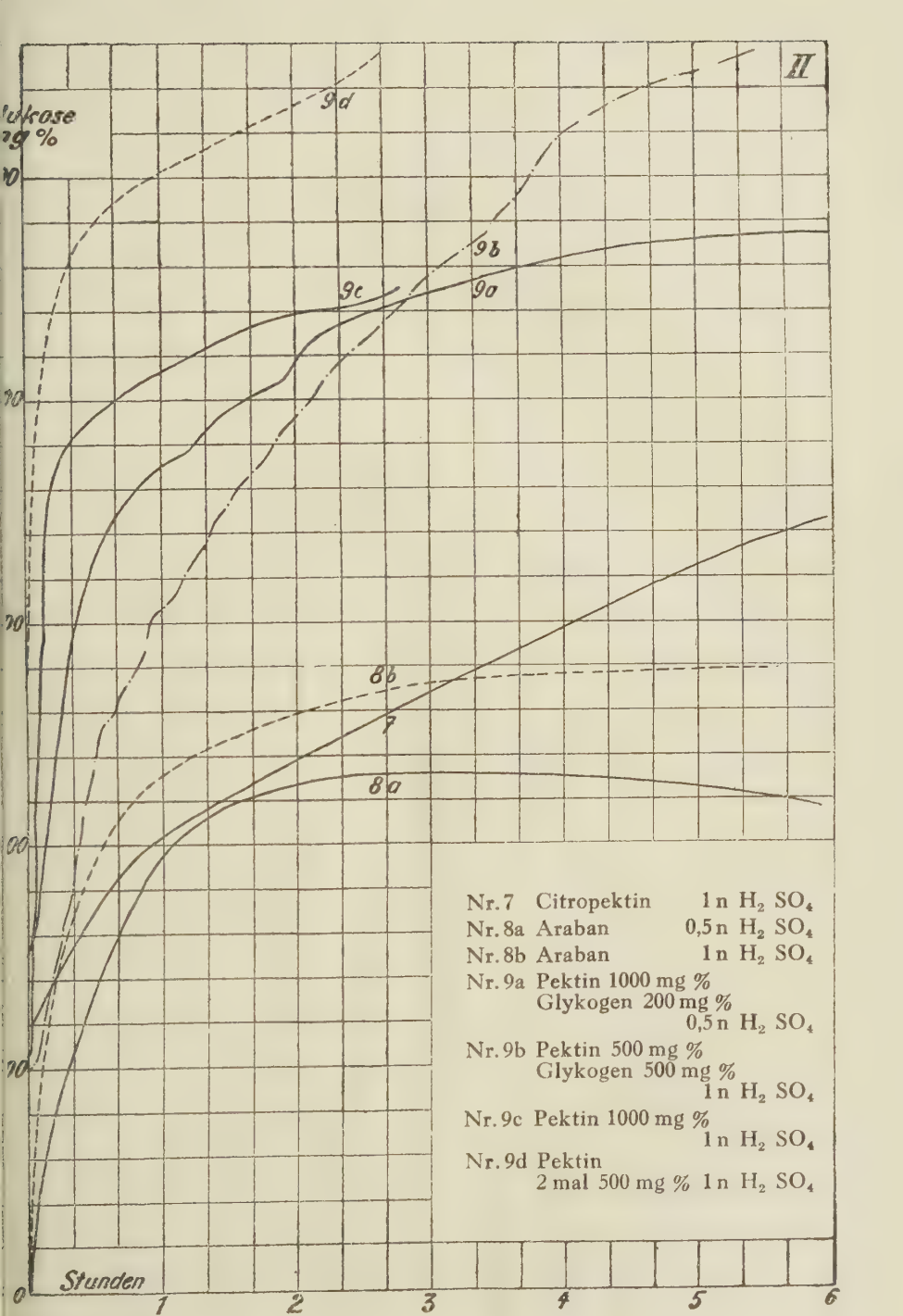
Aus den eben erwähnten Gründen wurde deshalb eine elektropotentiometrische Methode entwickelt, die den Fortgang der Hydrolyse wirklich kontinuierlich verfolgen läßt.

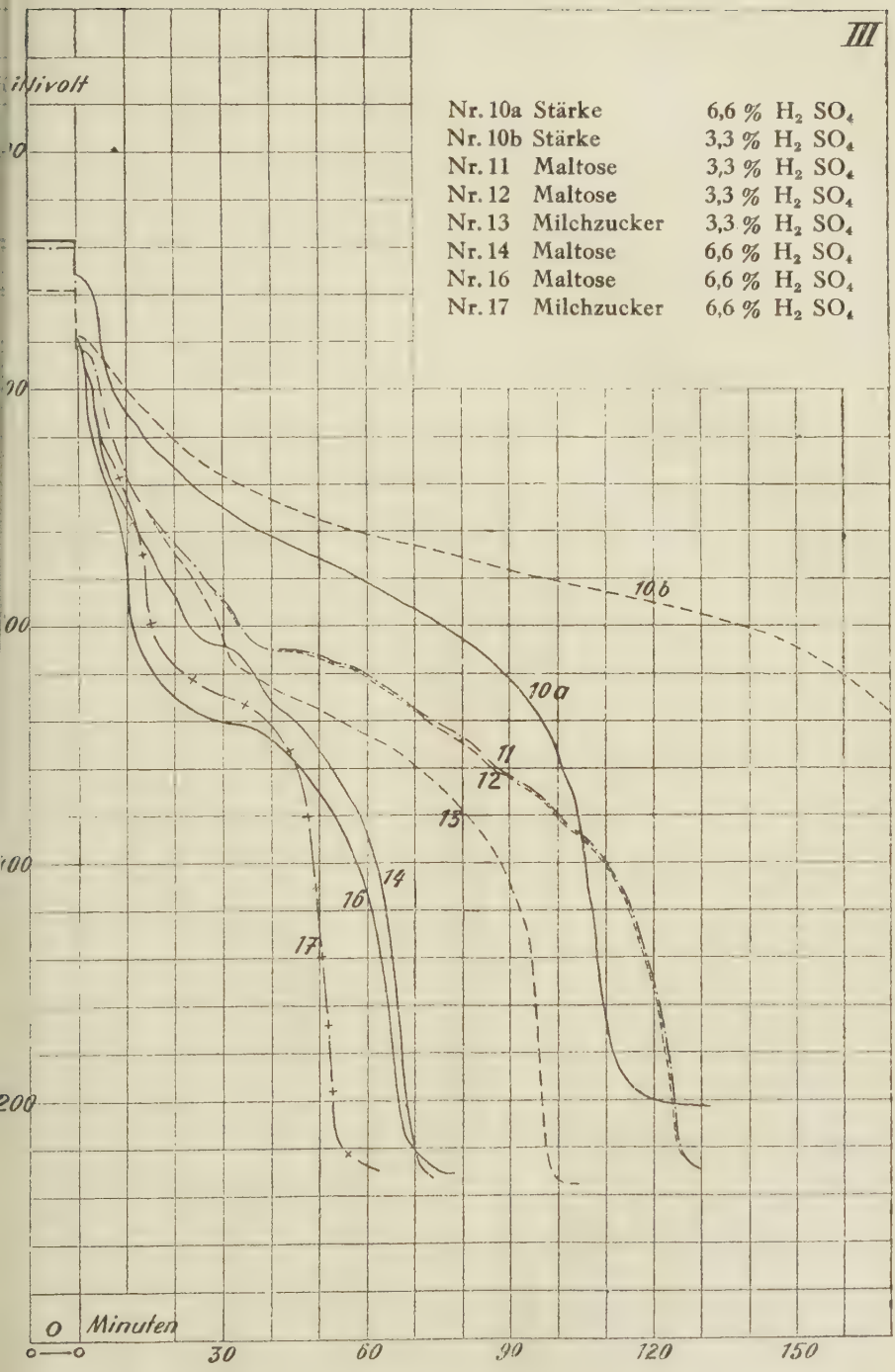
Das Prinzip der Methode ist folgendes: Eine Lösung eines Polysaccharides wird mit verdünnter Schwefelsäure in Gegenwart von stark verdünnter Kaliumbichromat-Lösung erhitzt. Die durch die Säure frisch abgespaltenen Monosaccharide treten mit dem Bichromat sofort in Reaktion, wobei die Kohlehydrate oxydiert und das Bichromat selbst in eine tiefere Oxydationsstufe übergeführt wird. Die Abnahme des Bichromates wird laufend durch die Änderung des elektrischen Potentiales mittels des Lautenschläger'schen Ultra-Ionographen bestimmt.

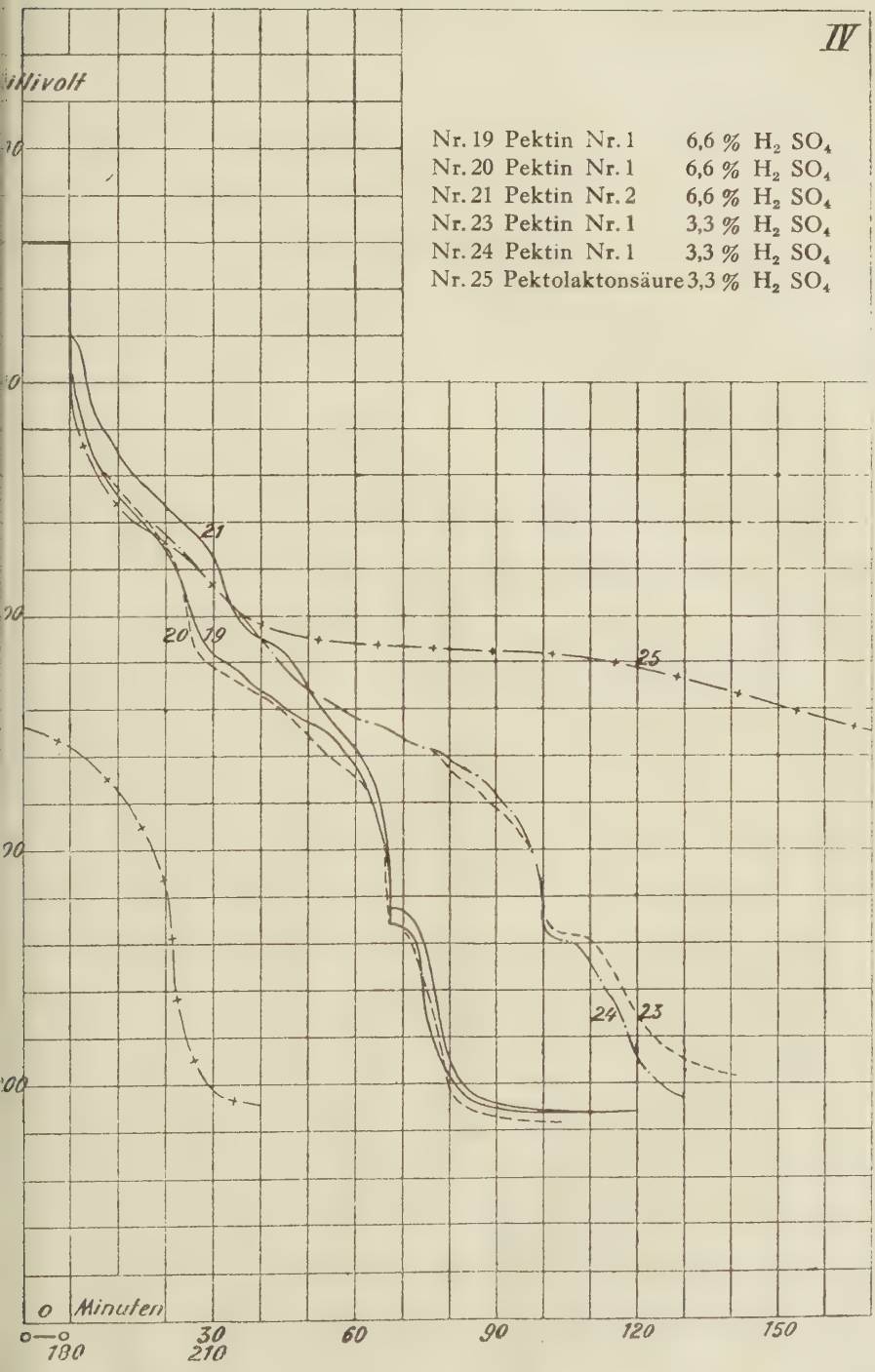
Als Ergebnis der elektropotentiometrischen Methode kann man feststellen, daß es wohl zum erstenmal gelungen ist, den Verlauf der Hydrolyse eines Polysaccharides wirklich völlig kontinuierlich zu verfolgen. Es ist auch einwandfrei gelungen den Wert und die Richtigkeit der Methode im Prinzip zu zeigen. Um die Methode noch zu verbessern, ist es vor allem nötig, an Stelle des Bichromates einen anderen Stoff zu finden, der zwar genau so schnell reagiert wie das Bichromat, aber doch selbst keine aktive Oxydations- oder Reduktionswirkung besitzt.

Am Schluß der Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Stepp für die freundliche Überlassung des Themas, sowie Herrn Dr. Lauersen für das große Interesse und die tatkräftige Unterstützung während der Arbeit auf das herzlichste zu danken.


I
ukose
g %
Stunden
0
1
2
3
4
5
6
3
4
1a
1b
5b
6
5a
2a
2b
Nr. 1a Stärke 1 n H_2SO_4
Nr. 1b Glykogen 1 n H_2SO_4
Nr. 2a Glykogen 0,5 n H_2SO_4
Nr. 2b Stärke 0,5 n H_2SO_4
Nr. 3 Apfelpektin Nr. 1 1 n H_2SO_4
Nr. 4 Apfelpektin Nr. 1 1 n H_2SO_4
Nr. 5a Apfelpektin Nr. 2 0,5 n H_2SO_4
Nr. 5b Apfelpektin Nr. 2 1 n H_2SO_4
Nr. 6 Apfelpektin Nr. 2 0,5 n H_2SO_4


II
9d
9b
9c
9a
8b
7
8a
Stunden
0
1
2
3
4
5
6
Nr. 7 Citropektin 1 n H_2SO_4
Nr. 8a Araban 0,5 n H_2SO_4
Nr. 8b Araban 1 n H_2SO_4
Nr. 9a Pektin 1000 mg %
Glykogen 200 mg %
0,5 n H_2SO_4
Nr. 9b Pektin 500 mg %
Glykogen 500 mg %
1 n H_2SO_4
Nr. 9c Pektin 1000 mg %
1 n H_2SO_4
Nr. 9d Pektin
2 mal 500 mg % 1 n H_2SO_4


Millivolt
Nr. 10a Stärke 6,6 % H_2SO_4
Nr. 10b Stärke 3,3 % H_2SO_4
Nr. 11 Maltose 3,3 % H_2SO_4
Nr. 12 Maltose 3,3 % H_2SO_4
Nr. 13 Milchzucker 3,3 % H_2SO_4
Nr. 14 Maltose 6,6 % H_2SO_4
Nr. 16 Maltose 6,6 % H_2SO_4
Nr. 17 Milchzucker 6,6 % H_2SO_4
10b
10a
11
12
13
14
16
17
0 Minuten
30
60
90
120
150


Millivolt
Nr. 19 Pektin Nr. 1 6,6 % H_2SO_4
Nr. 20 Pektin Nr. 1 6,6 % H_2SO_4
Nr. 21 Pektin Nr. 2 6,6 % H_2SO_4
Nr. 23 Pektin Nr. 1 3,3 % H_2SO_4
Nr. 24 Pektin Nr. 1 3,3 % H_2SO_4
Nr. 25 Pektolaktonsäure 3,3 % H_2SO_4
21
20
19
25
24
23
0 Minuten
30
60
90
120
150
180
210

Literaturverzeichnis

1. Abderhalden: Handbuch d. biol. Arb.-Meth. Chem.-Math. Teil 11, 2, 12, 2, S. 1485.
   Norman: Biochem. of Cellul. usw. Oxford 1937.
   Pringsheim: Polys. 1931.
   Karrer: Polymere Kohlehydrate.
   Freudenberg: Tannin, Zellulose und Lignin.
2. Haworth, Hirst: Journ. Chem. Soc. 1934. London.

Hydrolyse der Stärke:

3. Freudenberg: Ber. Dtsch.-chem. Ges. 69, 1258—66 (1936).

Kettenlängenbestimmung:

Hirst, Plaut, Wilkinson, Chem. Soc. London (1932) S. 2375.
Samec: Colloidchemie der Stärke. Dresden-Leipzig 1937.

4. Haworth, Hirst: Chem. Soc. London (1932) 2384.
5. Baker: J. C. S. 1900, 77. 696.
6. Heß u. Lüdtke: Ann. 1927. 456. 201.
7. Klages: Ann. 1934. 509. 159. 512. 185.
8. Pringsheim: Ann. 1928. 460. 32.
   Klages: Ann. 1936. 523. 224.
9. Neuberg: Biochem. Z. 1921. 125. 311.
   Hoffmann: J. Biol. Chem. 1925. 65. 379.
10. Nanji: J. Soc. Chem. Ind. 1925. 44. 253.
11. Link: J. Biol. Chem. 1933. 100. 385.
    Morell u. Bauer: J. Biol. Chem. 1934, 105. 1.
12. Schneider u. Bock: Angew. Chem. 1937, 51. Jg. No. 6.
13. Ehrlich: in Abderhalden: Biol. Arb.-Methoden, Abt. I. Teil 11, H. 7.
14. Marx: Dissertation (München 1939).
15. Butler u. Cretscher: J. Americ. Chem. Soc. 1929. 51. 1519.
16. Neville: Agr. Sci. 1923. S. 113.
17. Anderson: J. Amer. Chem. Soc. 1930. 52. 3711.
    J. Biol. Chem. 1933. 100. 249.
18. Nieman u. Link: J. biol. Chem. 1934. 104. 205.

20. Samec u. Isajewic: C. V, 176, 1419 (1923).
21. Böhm u. Hoffmann: Arch. exp. Path. 10. 12. (1879).
22. Steinberg u. Elberg: Kli. Wo. 1925. 2399.
23. May: J. Biol. 1931. 91. 2/5.
„ „ 1932. 92. 3/9.
„ „ 1934. 95. 409. 606. 614.
24. Levene: Monograph of the Rockefeller 3nst. and research. 84. 49. 1929.
Hexosamins. and Mucoproteins
London Long mans 1925.
25. Schulz u. Becker: Biochem. Z. 1935. 280, S. 217.
26. Masamune u. Hagine: J. of Biochem. 24. 219.—24. (1926.)
27. Meyer u. Palmer: J. of biol. Chem. 114. 689—703. (1936.) 119. 73 bis 84. (1936.)
28. Frank u. Scott: Biochemie. Journal 1936. S. 1927. — 33.
29. Jorpes u. Bergström: J. of Biol. Chem. 118. 447—457. (1937.)
30. Freudenberg: Liebig's Annal. 510. 543. (1934.)
31. Tasiro: Z. für Immunforschg. Bd. 93.
32. Hallauer: „ „ „ „ 83. (1934) S. 114.
33. Lauersen und Diehl: Z. f. exper. Medizin. Bd. 96. S. 625. (1935.)
34. Fränkel und Jellinek: Biochem. Z. 185. 1392. (1927.)
35. Dische: Biochem. Z. 201., 74. (1928.)
36. Rimington: Biochem. J. 25, 1931. S. 1062—71.
37. Bierry: C. Acad. Sc. Paris 192. 240—41. (1931.)
38. Hewitt und Frank: Biochem. J. 31. 360—366. (1937.)
39. Nilsson: Biochem. Z. 38, 37.
40. Tillmanns u. Philippi: Biochm. Z. 25—50. 215, 54. 117.
41. Sörensen: Biochem. Z. 260. 247. — 277.
42. Lustig u. Langer: Biochem. Zschr. 242. 320—37. (1931.)
43. Bierry: Paris. med. 1932. 137—44.
43a. Uhlenhuth: Zschr. f. Immunforschung. 1936. 88.
44. Hotchkiss u. Göbel: J. Biol. Chem. 121. (1937.)
45. Lindner: Zschr. f. Immunforschung 35. N. 86. 181.
46. Heidelberger usw.: J. of Biol. Chem. 118. 79—100. (1937.)
47. Klopstock: Zschr. f. Immunforschg. 90, 1937, S. 507.
48. Haurowitz: Med. Klinik. 1. 7. 38.
49. Kendall usw.: J. of Biol. Chem. 118. 61—69. (1937.)
50. Lindon: Indian J. med. Res. 24. 323—30. (1936.)
51. Campbell: J. of Parasital. 23. 348—353. (1937.)
52. Freudenberg: Ber. dtsch. chem. Ges. 69. 1258—66, (1936.)

Lebenslauf

Ich wurde am 15. August 1912 zu Gera als Sohn des Kaufmannes Hugo Wilke geboren. Von Ostern 1919 bis 1922 besuchte ich die Mittelschule zu Gera, um von da an das dortige Realgymnasium zu besuchen, an dem ich im Februar 1932 die Reifeprüfung ablegte.

Ich widmete mich darauf dem Studium der Medizin. Die 5 vorklinischen Semester studierte ich in Halle an der Saale, wo ich im Herbst 1934 das Physikum bestand. Die sämtlichen klinischen Semester verbrachte ich an der Münchner Universität. Am 17. Dezember 1937 beendete ich in München das Medizinische Staatsexamen.

Druck: Buch- und Kunstdruckerei J. M. Reindl, Bamberg